

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur Autophagie- abhängigen Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-II



vorgelegt von

Heike Maria Pfister

05. November 2012

angefertigt am Helmholtz Zentrum München

Erstgutachter: PD Dr. Josef Mautner

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Dissertation eingereicht am: 05. November 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Zusammenfassung/Summary.....	1
2 Einleitung.....	4
2.1 Die angeborene und die adaptive Immunabwehr	4
2.2 CD8+ T-zellvermittelte Immunabwehr	4
2.3 CD4+ T-zellvermittelte Immunabwehr	5
2.4 Die Antigenpräsentation	6
2.4.1 Die MHC-Moleküle	6
2.4.2 Klassische Antigenpräsentationswege	7
2.4.2.1 Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen.....	7
2.4.2.2 Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen.....	8
2.4.3 Alternative Antigenpräsentationswege.....	10
2.4.3.1 Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen.....	10
2.4.3.2 Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen.....	10
2.5 Autophagie.....	10
2.5.1 Makroautophagie	11
2.5.2 Chaperon-vermittelte Autophagie	13
2.5.3 Mikroautophagie.....	14
2.5.4 Beteiligung der Autophagie an der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen.....	14
2.5.5 Beteiligung der Autophagie an der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen.....	17
2.5.6 Makroautophagie als Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene.....	17
2.5.7 Die molekulare Regulation von Autophagie durch TOR.....	19
2.5.8 Autophagie und Apoptose	21
2.6 Fragestellung	22
3 Materialien	24
3.1 Chemikalien	24

3.2	Geräte	25
3.3	Verbrauchsmaterialien	26
3.4	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	27
3.5	Zellkulturmedien.....	27
3.6	Zelllinien	28
3.6.1	Lymphoblastoide Zelllinien	28
3.6.2	Burkitt-Lymphom Zelllinien	29
3.6.3	Adhärenz wachsende Epithelzelllinien	29
3.6.4	T-Zellen.....	29
3.6.4.1	T-Zellklone	29
3.6.4.2	T-Zelllinien	30
3.7	Bakterienstämme	30
3.8	Oligonukleotide für die Klonierung von shRNAs	30
3.9	Plasmide	31
3.10	DNA-modifizierende Enzyme	34
3.11	Antikörper.....	34
3.11.1	Primärantikörper.....	34
3.11.2	Sekundärantikörper	35
3.12	Zytokine	35
4	Methoden	36
4.1	Zellbiologische Methoden.....	36
4.1.1	Allgemeine Anmerkungen	36
4.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	36
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	36
4.1.4	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	37
4.1.4.1	Kultivierung adhärenz wachsender Zelllinien.....	37
4.1.4.2	Kultivierung von Suspensionszellen	37
4.1.4.3	Restimulation und Kultivierung von etablierten T-Zellen	37
4.1.5	Isolierung peripherer mononuklearer Zellen aus Vollblut durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	38
4.1.6	Herstellung von Viruskonzentrat.....	39

4.1.7	Transfektion von HEK293T-Zellen mit Polyethylenimin	39
4.1.8	Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation	39
4.1.8.1	Transfektion von Suspensionszellen mit dem GenePulser II von BioRad	39
4.1.8.2	Transfektion von Suspensionszellen mittels NEON-Technologie (Invitrogen)	40
4.1.9	Magnetische Zellseparation.....	40
4.1.10	Durchflusszytometrie.....	41
4.1.11	Analyse der T-Zell-Antigenerkennung	42
4.1.12	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	42
4.1.13	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	43
4.3	Molekularbiologische Methoden	43
4.3.1	Herstellung elektrokompeter Bakterien für die Transformation von Plasmid-DNA.....	43
4.3.2	Transformation von Bakterien	44
4.3.3	Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien.....	44
4.3.4	Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien.....	45
4.3.5	DNA-Klonierung	46
4.3.5.1	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	46
4.3.5.2	Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau	47
4.3.5.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	47
4.3.5.4	Phenol-Chloroform-Extraktion	48
4.3.5.5	Agarosegelelektrophorese.....	49
4.3.5.6	Isolierung und Aufbereitung von DNA-Fragmenten	49
4.3.5.7	Ligation zweier DNA-Moleküle	50
4.3.5.8	Klonierung von shRNA	50
4.3.5.9	DNA-Sequenzanalyse	50
4.4	Proteinbiochemische Methoden	51
4.4.1	Herstellung von RIPA-Extrakten.....	51
4.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
4.4.3	Coomassie-Färbung.....	52

4.4.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	52
4.4.4.1	Protein-Transfer (Western-Blot).....	52
4.4.4.2	Immunologischer Nachweis der Proteine	53
5	Ergebnisse.....	55
5.1	Etablierung eines Testsystems zur zeitlich getrennten Expression eines Modellantigens und der Modulation von Autophagie	55
5.1.1	Autophagie-abhängige Präsentation des Modellantigens NucNeoR auf MHC-Klasse-II nach konditionaler Expression in LCL.....	58
5.1.2	Etablierung von EBNA3C als Modellantigen für die Untersuchung der endogenen Präsentation auf MHC-Klasse-II.....	60
5.2	Untersuchung des Einflusses Autophagie-assoziiierter Gene auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-II.....	62
5.2.1	Der <i>knock-down</i> von Beclin-1 in antigenpräsentierenden Zellen führt nicht zu einer verringerten Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II.....	62
5.2.2	Weder die Überexpression von Wildtyp-Atg5 noch die Expression einer dominant-negativen Mutante haben Einfluss auf die Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II.....	67
5.2.3	Die Inhibierung von mTORC1 oder mTORC2 führt nicht zu einer verstärkten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II	71
5.3	Der <i>knock-down</i> von p62 in antigenpräsentierenden Zellen führt zu einer verringerten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II	76
5.4	Die Präsentation von Antigen auf MHC-Klasse-I versus MHC-Klasse-II wird durch verschiedene Ubiquitin-mutanten unterschiedlich beeinflusst.....	82
5.5	Die Präsentation auf MHC-Klasse-II setzt keine Ubiquitynylierung des Antigens voraus	94
5.5.1	Die im Vergleich zu NeoR verbesserte Präsentation von NucNeoR auf MHC-II beruht nicht auf seiner nukleären Lokalisation.....	94
5.5.2	Die effiziente Präsentation von NucNeoR auf MHC-II wird nicht durch Lysine in der NLS vermittelt.....	96
5.5.3	Die Mutation ubiquitynylierbarer Aminosäuren im viralen BZLF1-Protein führt nicht zu einer verminderten Präsentation auf MHC-Klasse-II.....	98
5.5.4	Für die endogene Präsentation auf MHC-II sind keine ubiquitynylierbaren Aminosäuren im Antigen notwendig.....	100
5.5.5	Die Entfernung ubiquitynylierbarer Aminosäuren im zellulären Protein MART1 vermindert die endogene Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II nicht	102
6	Diskussion.....	104

6.1	Etablierung eines konditionalen Testsystems zur zeitlich getrennten Expression eines Modellantigens und der Modulation von Autophagie.....	104
6.2	Der <i>knock-down</i> von Beclin-1 hat keinen Einfluss auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-II	104
6.3	Die Expression von Atg5 bzw. dnAtg5 hat keinen Einfluss auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-II.....	107
6.4	Die Inhibierung von mTORC1 oder mTORC2 führt nicht zu einer verstärkten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II	108
6.5	Der <i>knock-down</i> von p62 und die Expression der Ubiquitin-K63R-Mutante führen zu einer verringerten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II	110
6.6	Die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen wird durch die Überexpression der Ubiquitin-Mutanten nicht beeinflusst	112
6.7	Die Präsentation auf MHC-Klasse-II setzt keine Ubiquitinylierung des Antigens voraus	113
6.8	Werden die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentationswege aus dem gleichen intrazellulären Antigenpool gespeist?	117
6.9	Ausblick.....	119
7	Abbildungsverzeichnis	120
8	Tabellenverzeichnis	123
9	Abkürzungsverzeichnis	124
10	Literaturverzeichnis	127
	Danksagung	140
	Eidesstattliche Erklärung.....	141
	Lebenslauf.....	141

1 Zusammenfassung/Summary

Zusammenfassung

Die endogene Präsentation von intrazellulären Antigenen auf Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) -Klasse-II-Molekülen ist von entscheidender Bedeutung für eine Reihe von immunologischen Prozessen. Die mechanistischen Grundlagen dieses Präsentationsweges sind aber noch weitgehend unverstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Autophagie-abhängige Präsentation von intrazellulären Antigenen auf genetischer Ebene untersucht und damit die experimentellen Grundlagen für die nähere Charakterisierung dieses Präsentationsweges geschaffen werden. Dazu wurde ein konditionales Vektorsystem etabliert, das eine unabhängige Expression von Autophagie-modulierenden *short-hairpin* (sh)-RNAs bzw. Proteinen und Modellantigenen in Antigen-präsentierenden Zellen ermöglicht.

Die endogene Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-II wurde in diesem Zellsystem aber weder durch die Überexpression des Autophagie-assozierten Genprodukts Atg5 bzw. einer dominant-negativen Atg5-Mutante noch durch den *knock-down* von Beclin-1 oder die Inhibition von mTOR beeinflusst. Dagegen führte der *knock-down* von p62 zu einer Inhibition der Antigenpräsentation auf MHC-II. Die als interne Kontrolle mituntersuchte Antigenpräsentation auf MHC-I war davon nicht beeinträchtigt. Da das Adaptorprotein p62 ubiquitinylierte Proteine bindet und diese in Autophagosomen dirigiert, deuteten diese Ergebnisse auf eine selektive Aufnahme Ubiquitin-markierter Antigene in den Autophagie-abhängigen Präsentationsweg hin. Dafür sprach auch, dass die Expression einer Ubiquitinmutante, in der das Lysin an Aminosäureposition 63 zu Arginin mutiert (Ub-K63R) worden war und somit keine Verkettung zu Polyubiquitin an diesem Lysin mehr erfolgen konnte, zu einer verringerten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II führte. Erstaunlicherweise verstärkte Ub-K63R die Präsentation des Modellantigens auf MHC-Klasse-I, wohingegen die Ubiquitinmutante Ub-K48R einen gegenteiligen Effekt zeigte: Die Präsentation des Modellantigens auf MHC-Klasse-I war vermindert und die auf MHC-Klasse-II verstärkt. Da durch die Ubiquitinmutanten weder die MHC-II-Oberflächenexpression noch der klassische MHC-Klasse-II-Präsentationsweg beeinträchtigt wurden, deuteten diese Ergebnisse auf eine direkte Polyubiquitinylierung der Antigene hin. Überraschenderweise verminderte die Mutation sämtlicher

ubiquitinierbarer Aminosäuren innerhalb der Modellantigene aber nicht deren Präsentation auf MHC-II.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die endogenen MHC-I- und MHC-II-Präsentationswege aus einem gemeinsamen Pool an Antigenen gespeist werden und die differentielle Polyubiquitinierung von Komponenten der Präsentationswege über das Schicksal dieser Antigene entscheidet.

Summary

The endogenous presentation of intracellular antigens on major histocompatibility complex (MHC) class II molecules is of critical importance in a number of immunological processes. The mechanistic details of this presentation pathway, however, are still largely unknown.

The aim of this study was to develop a genetic approach for the characterization of this autophagy-dependent antigen presentation pathway. For this a conditional vector system was established, that permits to separately express model antigens and autophagy-modulating short-hairpin RNAs or modulating proteins in antigen presenting cells.

In this cell system, the endogenous presentation of intracellular antigens on MHC-II was neither affected by overexpressing the autophagy-associated gene product Atg5 or a dominant-negative Atg5 mutant nor by the knock-down of Beclin-1 or the inhibition of mTOR. In contrast, the knock-down of p62 led to a decrease in antigen presentation on MHC-II, while antigen presentation on MHC-I, which served as internal control, was not affected. Given that the adaptor protein p62 binds ubiquitinated proteins and directs them into autophagosomes, these results suggested that ubiquitinated antigens are selectively imported into the autophagy-dependent presentation pathway. This notion was further supported by the finding, that the expression of a ubiquitin mutant, in which the lysine residue at position 63 was mutated to arginine (Ub-K63R) and therefore was unable to form polyubiquitin sidechains on this residue, decreased antigen presentation on MHC-II. Surprisingly, antigen presentation on MHC-I was increased by this Ub-K63R-mutant. In contrast, the Ub-K48R-mutant led to the opposite effect: antigen presentation on MHC-I was decreased, and increased on MHC-II. Since neither MHC-II cell surface expression nor the presentation of exogenous antigens on MHC-class-II was affected by the ubiquitin mutants, these results pointed towards antigens as direct targets of polyubiquitination. Unexpectedly, the mutation of all potential ubiquitination sites within the model antigens did not impair antigen presentation on MHC-II.

These results suggest that the endogenous MHC-I and MHC-II presentation pathways are furnished by the same antigen pool and that differential polyubiquitination of components of the presentation pathways decides on the fate of the antigens.

2 Einleitung

2.1 Die angeborene und die adaptive Immunabwehr

Zum Schutz des Organismus vor Pathogenen hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem entwickelt, welches sich in einen angeborenen und einen erworbenen, adaptiven Teil untergliedern lässt. Das angeborene Immunsystem bildet eine erste Barriere gegen eindringende Mikroorganismen. Es ist nicht antigenspezifisch, kann aber zwischen Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten unterscheiden. Über sogenannte mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRR), wie z.B. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR), werden konservierte Merkmale dieser Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMP) erkannt (Albiger et al., 2007). Dazu zählen z.B. Lipopolysaccharide und Peptidoglykane der Bakterienzellwand oder doppelsträngige RNA mancher RNA Viren. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und das Komplementsystem.

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch eine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Dadurch können spezifische Merkmale der Pathogene erkannt und gezielt Abwehrreaktionen ausgelöst werden. Die wesentlichen Komponenten der adaptiven Immunantwort stellen T- und B-Zellen dar. Über ihren klonotypischen Antigenrezeptor erkennen sie spezifische Merkmale von Pathogenen. Während die durch B-Zellen produzierten Antikörper hauptsächlich zur Beseitigung extrazellulärer Pathogene beitragen, vermitteln T-Zellen auch Immunität gegenüber intrazellulären Pathogenen und gegenüber Tumorzellen. Nach überstandener Infektion bleiben antigenspezifische Gedächtniszellen erhalten, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Pathogen binnen kurzer Zeit eine Abwehrreaktion auslösen (Murphy, 2008).

2.2 CD8+ T-zellvermittelte Immunabwehr

CD8+ zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTL) spielen bei der Bekämpfung von Viren und intrazellulären Bakterien, aber auch von Tumorzellen eine große Rolle. CTL können über mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen Zielzellen eliminieren. Zum einen schütten aktivierte CD8+ zytotoxische T-Zellen lytische Granula aus, wodurch es zur Freisetzung von Perforin und Granzymen in den Spalt der

immunologischen Synapse kommt. Perforin polymerisiert zu Poren in der Membran der Zielzelle. Granzyme gehören zu der Familie der Serinproteasen und aktivieren in der Zielzelle eine Caspasekaskade, die letztendlich Apoptose induziert (Edwards et al., 1999). Zum anderen können CTL in Zielzellen Apoptose über die Bindung des Fas-Liganden an Fas auslösen (Medana et al., 2000). Darüber hinaus sezernieren sie Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β). IFN- γ hemmt die virale Replikation und führt zur verstärkten Expression von Molekülen, die eine Rolle im MHC-Klasse-I-Präsentationsweg spielen. Außerdem führt es zur Aktivierung von Makrophagen und deren Rekrutierung zum Infektionsherd. TNF- α und TNF- β tragen einerseits zur Aktivierung von Makrophagen bei und können andererseits durch ihre Interaktion mit dem Tumornekrosefaktor-rezeptor-I (TNFR-I) zur Eliminierung der Zielzelle beitragen (Pickart, 2001).

2.3 CD4+ T-zellvermittelte Immunabwehr

CD4+ T-Zellen können zu verschiedenen Effektor-T-Zellen mit unterschiedlichen Funktionen differenzieren. Die wichtigsten CD4+ Subpopulationen sind T_H1 , T_H2 , T_H17 und regulatorische T-Zellen. Diese Einteilung basiert in erster Linie auf dem von den T-Zellen sezernierten Zytokinmuster.

T_H1 Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die Kontrolle von viralen Infektionen und intrazellulären Bakterien. Nach Infektion mit z.B. Mykobakterien, die Tuberkulose oder Lepra auslösen können, aktivieren T_H1 Zellen die mikrobizide Aktivität von infizierten Makrophagen, wodurch die intrazellulär lokalisierten Bakterien zerstört werden. Das Hauptkennzeichen von T_H1 Zellen ist die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ), sie produzieren aber auch IL-2, TNF- α und TNF- β (Glimcher and Murphy, 2000). Auch wurde für T_H1 Zellen beschrieben, dass sie über eine Fas-Ligand-Fas-Interaktion Apoptose in Zielzellen auslösen können (Stalder et al., 1994).

Das Hauptzytokin, welches T_H2 Zellen sezernieren, ist IL-4. Darüber hinaus produzieren sie noch weitere Zytokine wie z.B. IL-5, IL-10 und IL-13, welche wichtig sind für die Ausbildung der humoralen Immunantwort, aber auch bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielen (Glimcher and Murphy, 2000, Paul and Seder, 1994).

T_H17 Zellen sind durch die Sezernierung von IL-17 gekennzeichnet, sie produzieren allerdings auch TNF- α , IL-6, IL-21, IL-22 und IL-26. Sie spielen eine Rolle bei der Kontrolle opportunistischer Infektionen, verursacht z.B. durch *Candida albicans*, tragen

aber vermutlich auch zur Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie z.B. IBD (*inflammatory bowel disease*) oder Morbus Crohn (Munz, 2011), bei.

CD4⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind durch die Expression von CD25 und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 gekennzeichnet. Ihre immunsuppressive Wirkung auf andere T-Zellsubpopulationen wird unter anderem über die Sekretion von IL-10 und TGF- β vermittelt (Zhu et al., 2010).

2.4 Die Antigenpräsentation

2.4.1 Die MHC-Moleküle

Fast alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle, MHC-Klasse-II-Moleküle werden hingegen nur von professionellen, antigenpräsentierenden Zellen, wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert. Auf MHC-Klasse-I-Molekülen werden Peptide an CD8⁺ zytotoxische T-Zellen präsentiert, während Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (Pickart, 2001).

MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterscheiden sich auch in ihrer Struktur. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer polymorphen α -Kette, welche im MHC-Locus auf Chromosom 6 kodiert wird, und der nicht-polymorphen, auf Chromosom 15 kodierten β_2 -Mikroglobulin-Kette, welche mit der α -Kette nicht-kovalent assoziiert ist. Im humanen System kodieren drei verschiedene Gene (HLA-A, HLA-B, HLA-C) für die schwere α -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls. Diese besteht aus drei Domänen, wobei die α_3 -Domäne die Zellmembran durchspannt. Die α_1 - und α_2 -Domäne bilden die Peptidbindetasche, welche Peptide einer Länge von 8-10 Aminosäuren binden kann. Die Peptide sind an ihren beiden Enden in der Peptidbindegrube verankert. (Bouvier, 2003, Rammensee et al., 1993).

MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Diese sind nicht-kovalent miteinander assoziiert und durchspannen beide die Zellmembran. Sie sind ebenfalls im MHC-Locus auf Chromosom 6 kodiert. Die α -Kette besteht aus einer α_1 - und einer α_2 -Domäne, die β -Kette aus einer β_1 - und einer β_2 -Domäne. MHC-Klasse-II-Moleküle werden, wie die schwere Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle, von drei polymorphen Genen (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) kodiert. Der Polymorphismus der MHC-Proteine resultiert hauptsächlich in verschiedenen Peptidbindegruben (Trowsdale, 2005).

Die Peptidbindegroove wird von der α_1 und der β_1 -Domäne gebildet (Rammensee et al., 1993). Peptide, die von MHC-Klasse-II Molekülen gebunden werden, bestehen aus 12 bis über 20 Aminosäuren (AS). Eine Kernregion dieser Peptide, welche 9 AS umfasst, kann über die Seitenketten der AS 1, 4, 6 und 9 in der Peptidbindetasche verankert werden (Wang et al., 2008). Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I gebundenen Peptiden sind die Enden der Peptide, die auf MHC-Klasse-II Molekülen gebunden sind, nicht fest in der Bindegroove verankert und können darüber hinaus ragen.

2.4.2 Klassische Antigenpräsentationswege

2.4.2.1 Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren intrazelluläre Antigene, welche durch proteasomalen Abbau generiert wurden, an der Zelloberfläche an CD8+ T-Zellen.

Ubiquitinylierung markiert Proteine für den proteasomalen Abbau durch das 26S Proteasom (Neefjes et al., 2011). Dieses besteht aus einer 20S Kernuntereinheit, welche Proteaseaktivität besitzt, sowie aus zwei 19S regulatorischen Einheiten. In Immunzellen existiert ein alternatives Proteasom, das Immunproteasom, welches im Vergleich zum 26S Proteasom höhere Substratabbauraten aufweist. Außerdem entstehen durch eine veränderte Spaltpräferenz vermehrt Peptide, welche einen geeigneten C-Terminus für die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen besitzen. Zudem generieren Immunproteasomen Vorläuferpeptide mit einer verlängerten N-terminalen Sequenz, was den Transport durch TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) begünstigt (Sijts and Kloetzel, 2011, Seifert et al., 2010, Strehl et al., 2008). Insgesamt werden somit durch das Immunproteasom vermehrt Peptide für die Präsentation auf MHC-Klasse-I generiert.

Die so entstandenen Peptide werden ggf. durch zytosolische Peptidasen und im Lumen des ER durch Aminopeptidasen wie ERAP1 und ERAP2 (*ER aminopeptidases associated with antigen processing*) zu Peptiden von 8-10 Aminosäuren weiter prozessiert (Neefjes et al., 2011, Saveanu et al., 2005). Neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Heterodimere interagieren mit dem Peptidladekomplex (*peptide loading complex, PLC*), welcher aus TAP und Chaperonen wie Tapasin, Calretikulin und ERp57 besteht. Nach Bindung hochaffiner Peptide wird der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex aus dem PLC entlassen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (Wearsch and Cresswell, 2008).

Da die Stabilität von Proteinen stark variiert, sollte die Präsentation von Peptiden in Abhängigkeit von der Halbwertszeit des Proteins erfolgen. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung widerlegt, dass virale Antigene schneller auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, als ihre Halbwertszeiten dies erwarten ließen. Diese Beobachtung kann durch die Entstehung sogenannter DRiPs (*defective ribosomal products*) erklärt werden, welche das Resultat fehlerhafter Transkription, Translation, post-translationaler Modifikation oder Proteinfaltung sind. DRiPs werden sofort abgebaut, um Proteinaggregate zu vermeiden und das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Peptide, die auf MHC-Klasse-I präsentiert werden, stammen hauptsächlich von diesen neu synthetisierten Translationsprodukten und weniger von funktionalen, reifen Proteinen ab (Reits et al., 2000, Yewdell and Nicchitta, 2006, Schubert et al., 2000).

2.4.2.2 Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen

MHC-Klasse-II-Moleküle werden im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cells*), wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, exprimiert (Neefjes et al., 2011). Die Expression kann allerdings auch in anderen Zelltypen, wie z.B. Endothel- oder Epithelzellen, durch IFN- γ -Behandlung induziert werden (Geppert and Lipsky, 1985, Mulder et al., 2011). Die membranständigen α - und β -Ketten werden im ER zu MHC-Klasse-II-Molekülen zusammengefügt, welche dort zusätzlich mit der invarianten Kette (Ii) assoziieren. Ii trägt zur Stabilisierung des MHC-Klasse-II-Moleküls bei. Darüber hinaus blockiert sie die Peptidbindegrube, was eine frühzeitige Beladung mit Peptiden im ER verhindert und zu einer Trennung des klassischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentationsweges führt. Der zytoplasmatische Teil der invarianten Kette besitzt überdies hinaus ein *di-leucine sorting motif*, welches durch den *trans*-Golgi Adapter AP1 oder den Plasmamembran Adapter AP2 erkannt wird. Somit dirigiert Ii die MHC-Klasse-II-Moleküle entweder direkt über das *trans*-Golgi Netzwerk oder durch Endozytose über die Plasmamembran in das endolysosomale Kompartiment (Landsverk et al., 2009, Hofmann et al., 1999). Dort wird ein großer Teil der invarianten Kette durch die Proteasen Cathepsin S und Cathepsin L abgebaut (Hsing and Rudensky, 2005), wobei nur ein kurzes Peptid der invarianten Kette (CLIP, *class II-associated Ii peptide*) in der Peptidbindegrube zurückbleibt. Mit Hilfe des Chaperons HLA-DM wird CLIP entfernt, wodurch eine Bindung von antigenen Peptiden stattfinden kann. Diese Peptide stammen von exogenen Proteinen ab. Exogene Bestandteile werden über Endozytose von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und

gelangen somit in Endosomen. In diesen werden durch schrittweise Ansäuerung Proteasen aktiviert, welche die endozytierten Antigene in Peptide spalten. Nach Fusion der Endosomen mit dem MHC-II-Kompartiment (MIIC) können die so generierten Peptide auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden (Murphy, 2008). Die MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe werden über Transportvesikel an die Zelloberfläche transportiert, wo sie ca. 36 Stunden präsentiert werden (Turley et al., 2000).

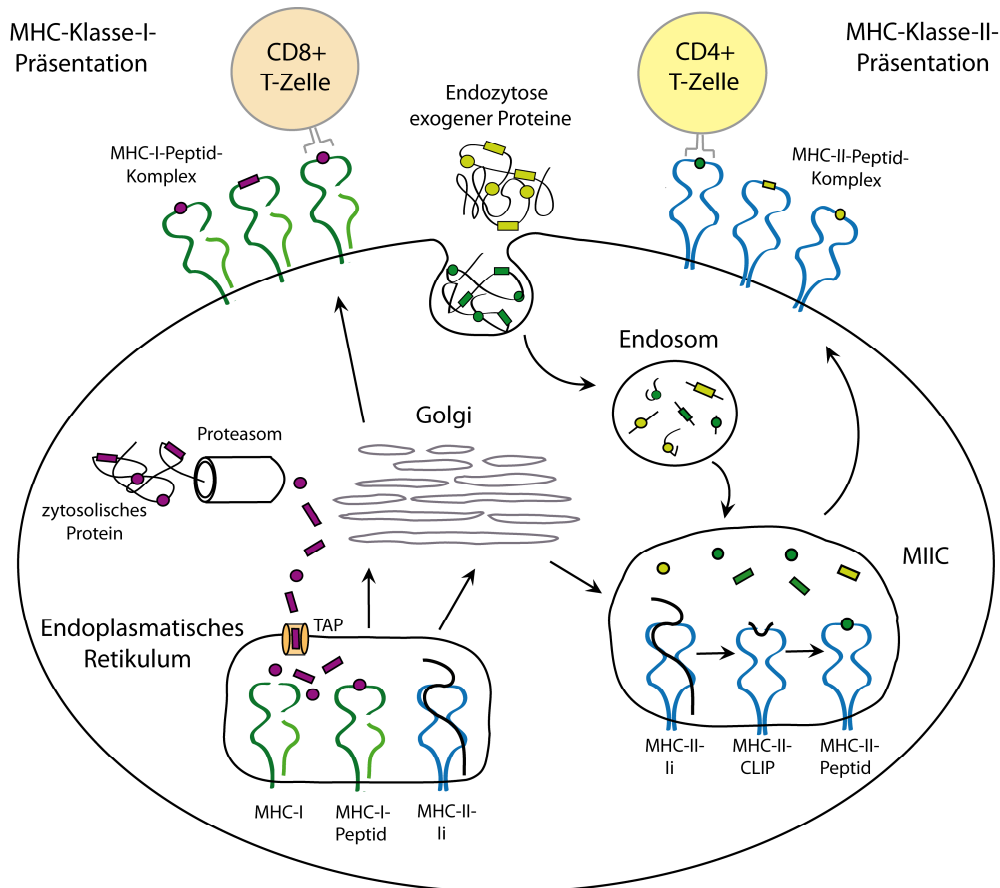


Abbildung 2.1: Klassischer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentationsweg

Intrazelluläre Proteine werden über das Proteasom zu Peptiden abgebaut, die anschließend über den *transporter associated with antigen processing* (TAP) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden. Nach weiterer Prozessierung durch Aminopeptidasen zu Peptiden von 8-10 Aminosäuren (AS) Länge binden die Peptide an neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle. Die MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe werden anschließend über das *trans*-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von CD8+ T-Zellen erkannt werden können. Die ebenfalls in das ER synthetisierten MHC-Klasse-II-Moleküle sind mit der invarianten Kette (Ii) assoziiert, wodurch eine Peptidbeladung im ER verhindert wird. Die MHC-Klasse-II-Ii-Komplexe werden über das *trans*-Golgi-Netzwerk in das MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) transportiert, wo Ii abgebaut und durch in Endosomen generierte Peptide ausgetauscht wird. Diese Peptide stammen von Proteinen ab, welche durch Endozytose aufgenommen wurden. Die MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und an CD4+ T-Zellen präsentiert (verändert nach Heath and Carbone, 2001).

2.4.3 Alternative Antigenpräsentationswege

2.4.3.1 Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen

Erste Hinweise darauf, dass exogene Antigene auch auf MHC-Klasse-I-Molekülen an CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden, lieferten Experimente Mitte der 1970er Jahre. Hierbei wurden Milz-Zellen einer Spender-Maus mit einem MHC-Typ H-2b in Empfänger-Mäuse, die H-2b und H-2d exprimierten, transplantiert. Die Mäuse unterschieden sich auch in ihrem genetischen Hintergrund außerhalb des MHC-Locus. Die Empfänger-Mäuse entwickelten unter anderem eine CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen die Spender-Zellen, obwohl nur eine CD4⁺ T-Zell-Antwort erwartet worden war (Bevan, 1976). Diese Präsentation von extrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-I wird auch Kreuzpräsentation genannt. Endozytierte Antigene translozieren dabei in das Zytosol und münden dort in den klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg ein. Die Kreuzpräsentation ist von entscheidender Bedeutung für die Induktion von CD8⁺ T-Zell-Immunantworten gegen Pathogene, die APC nicht selber infizieren sowie gegen Tumorantigene (Ackerman and Cresswell, 2004).

2.4.3.2 Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen

Über einen alternativen, Autophagie-assoziierten Präsentationsweg können auch intrazelluläre Antigene auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen und an CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden. Dieser Weg beinhaltet den Einschluss zytoplasmatischer Bestandteile in Autophagosomen, welche mit dem MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) fusionieren. Dadurch gelangen intrazelluläre Antigene in den endolysosomalen Degradationsweg. Im folgenden Kapitel werden die verschiedenen Autophagiearten und deren Beitrag zur Antigenpräsentation näher beschrieben.

2.5 Autophagie

Das Wort Autophagie leitet sich von den griechischen Worten „autos“ („selbst“) und „phagein“ („essen“) ab und beschreibt Prozesse, bei denen zytosolische Bestandteile in den lysosomalen Degradationsweg geschleust werden. Während kurzlebige Proteine primär über das Proteasom abgebaut werden, gelangen langlebige Proteine bevorzugt in den lysosomalen Abbauweg (Henell et al., 1987). Ein Beispiel hierfür ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), welche eine Halbwertszeit

von 130 h hat und als Substrat der Autophagie beschrieben wurde (Aniento et al., 1993). Es existieren drei verschiedene Autophagiearten: die Makroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) und die Mikroautophagie. Autophagie findet vermutlich in allen Zellen auf einem basalen Niveau statt und kann durch bestimmte Signale, wie z.B. Nährstoffmangel, stark induziert werden (Hara et al., 2006, Mizushima and Levine, 2010).

Durch Autophagie werden auch beschädigte oder überflüssige Zellorganellen entfernt, wie z.B. Mitochondrien und Peroxisomen, oder Organellteile, wie Regionen des Golgi-Apparates oder des ER (Codogno and Meijer, 2005, Meijer and Codogno, 2004).

2.5.1 Makroautophagie

Bei der Makroautophagie handelt es sich um einen Prozess, bei dem Teile des Zytoplasmas durch eine Doppelmembran umschlossen werden und sogenannte Autophagosomen bilden. Die Quelle dieser Membranen ist bislang weitgehend unbekannt. Autophagosomen fusionieren mit späten Endosomen oder Lysosomen zu Amphisomen bzw. Autolysosomen. In diesen Vesikeln werden die umschlossenen zytoplasmatischen Bestandteile sowie die innere Autophagosomenmembran durch lysosomale Hydrolasen degradiert. An der Entstehung von Autophagosomen sind zwei ubiquitinähnliche Konjugationssysteme sowie ein Lipidkinasesignalkomplex beteiligt (Munz, 2009). Eines dieser Systeme ligiert Atg8 (Hefe) bzw. LC3 (Atg8-Ortholog in Säugetieren) an Phosphatidylethanolamin (PE) an der inneren und äußeren Seite der sich bildenden Autophagosomenmembran. Atg8/LC3 (in seiner unprozessierten Form auch LC3-I genannt) wird zuvor durch die zytosolische Protease Atg4 durch Abspaltung fünf C-terminaler Aminosäuren prozessiert, wodurch ein C-terminaler Glycin-Rest (G120) entsteht. LC3 wird daraufhin durch das E1-ähnliche Enzym Atg7 aktiviert und durch das E2-ähnliche Enzym Atg3 an PE konjugiert, wodurch LC3-II entsteht. Nach Bildung des Autophagosoms wird das an die äußere Autophagosomenmembran konjugierte LC3-II durch Atg4 abgespalten. LC3-II, welches hingegen an der inneren Autophagosomenmembran verankert ist, bleibt mit dem Autophagosom assoziiert und wird zusammen mit der Membran durch lysosomale Hydrolasen abgebaut. Obwohl LC3-II durch die Lipidkonjugation ein höheres Molekulargewicht besitzt als LC3-I, wandert es aufgrund seiner Hydrophobizität im SDS-Polyacrylamidgel schneller als LC3-I (Mizushima et al., 2010). Der Umsatz von LC3-I zu LC3-II wird allgemein zur Quantifizierung von Autophagie herangezogen (Klionsky et al., 2008). Die genaue Funktion von LC3 ist noch nicht ganz geklärt, es

gibt jedoch zwei Modelle. Atg8/LC3 könnte zum einen die Fusion von Membranvesikeln zum Aufbau der Autophagosomenmembran verstärken. In diesem Zusammenhang konnte in Hefe gezeigt werden, dass Liposomen, welche PE-gekoppeltes Atg8 enthielten, Hemifusion durchführen konnten, welche für die Autophagosomenvergrößerung notwendig ist (Nakatogawa et al., 2007, Xie et al., 2008). Alternativ könnte Atg8/LC3 auch dazu beitragen, dass Substrate gebunden und in die sich bildenden Autophagosomen aufgenommen werden. Hinweise hierfür liefert das Protein p62/Sequestom1, von dem gezeigt wurde, dass es zum einen an polyubiquitinylierte Proteinaggregate und zum anderen an Atg8/LC3 bindet und somit diese Proteine in den Autophagie-abhängigen Degradationsweg dirigieren kann (Pankiv et al., 2007, Bjorkoy et al., 2005). Vor allem in Neuronen scheint die selektive Autophagie von ubiquitinylierten Proteinaggregaten über Adaptorproteine wie p62 oder auch NBR1 eine präventive Funktion zur Vermeidung von Neurodegeneration auszuüben (Knaevelsrud and Simonsen, 2010, Lee, 2012).

Für die Bildung von Autophagosomen ist noch ein weiteres Ubiquitin-ähnliches Konjugationssystem notwendig. Hierbei wird Atg12 an Atg5 konjugiert, welches anschließend einen Komplex mit Atg16L1 an der äußeren Autophagosomenmembran bildet. Atg12 wird während dieses Prozesses über seinen C-terminalen Glycinrest (G140) an einen Lysinrest im Atg5-Protein (K149) mit Hilfe des aktivierenden, E1-ähnlichen Atg7 und des konjugierenden, E2-ähnlichen Atg10-Enzyms gekoppelt (Mizushima et al., 1998). Während der Vergrößerung der äußeren Isolationsmembran bleibt der Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplex mit dieser assoziiert, dissoziiert allerdings nach Fertigstellung des Autophagosoms ab. Die Funktion des Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplexes ist noch nicht vollständig geklärt, es wird aber angenommen, dass dieser als E3-ähnliche Ligase für die Lipidierung von Atg8/LC3 fungiert (Hanada et al., 2007). Für diesen Vorgang muss zuerst allerdings die Bildung der Autophagosomen initiiert werden. Hieran ist ein Komplex aus der Klasse III-Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K/VPS34) und Atg6/Beclin-1 beteiligt. Durch die PI3K-Inhibitoren 3-Methyladenin (3-MA), Wortmannin und LY294002 kann Autophagie pharmakologisch inhibiert werden (Seglen and Gordon, 1982, Blommaart et al., 1997).

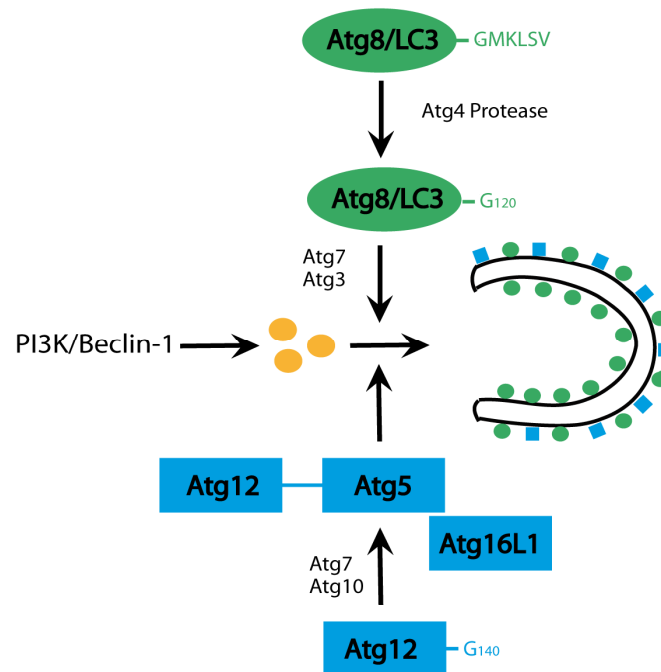


Abbildung 2.2: Makroautophagie-assoziierte Proteine, die bei der Bildung von Autophagosomen zusammenwirken

An der Ausbildung von Autophagosomen sind zwei ubiquitinähnliche Konjugationssysteme sowie ein Lipidkinasesignalkomplex beteiligt. Eines dieser Systeme ligiert Atg8/LC3 an Phosphatidylethanolamin (PE) der inneren und äußeren Autophagosomenmembran. Zuvor prozessiert die zytosolische Protease Atg4 Atg8 durch Abspaltung fünf C-terminaler Aminosäuren, wodurch ein C-terminaler Glycin-Rest (G120) entsteht. Das E1-ähnliche Enzym Atg7 aktiviert und das E2-ähnliche Enzym Atg3 konjugiert Atg8 an PE. Nach Bildung des Autophagosoms spaltet Atg4 das an die äußere Autophagosomenmembran konjugierte Atg8 ab. An der inneren Autophagosomenmembran verankertes Atg8 bleibt hingegen mit dem Autophagosom assoziiert und wird zusammen mit der Membran durch lysosomale Hydrolasen abgebaut. In einem zweiten Ubiquitin-ähnlichen System wird Atg12 an Atg5 konjugiert, welches anschließend einen Komplex mit Atg16L1 an der äußeren Autophagosomenmembran bildet. Atg12 wird über seinen C-terminalen Glycinrest (G140) an einen Lysinrest im Atg5-Protein (K149) mit Hilfe des E1-ähnlichen Atg7 und des E2-ähnlichen Atg10 Enzyms gekoppelt. Der Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplex bleibt während der Vergrößerung der äußeren Membran mit dieser assoziiert, dissoziiert allerdings nach Fertigstellung des Autophagosoms davon ab. Vermutlich fungiert der Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplex als E3-ähnliche Ligase für die Lipidierung von Atg8/LC3. Die Initiierung der Autophagosomenbildung wird durch einen Komplex aus der Klasse III-Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K/VPS34) und Atg6/Beclin-1 gesteuert (verändert nach Münz, 2009).

2.5.2 Chaperon-vermittelte Autophagie

Während durch Makroautophagie zytoplasmatisches Material mit Hilfe von Vesikeln in Lysosomen eingeschleust wird, wird in der sogenannten Chaperon-vermittelten Autophagie diese Funktion von einem Transportkanal in der Lysosomenmembran übernommen.

Durch Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA, *chaperon-mediated autophagy*) werden gezielt Proteine mit einer bestimmten Signalsequenz in Lysosomen importiert. Das Pentapeptid KFERQ der RNaseA wurde als erstes, den lysosomalen Import vermittelndes Signalpeptid identifiziert. In nachfolgenden Untersuchungen konnten Pentapeptide als prototypische Signalsequenzen beschrieben werden, in denen einem Glutamin eine oder zwei basische bzw. eine oder zwei hydrophobe Aminosäuren voran- oder nachgestellt sind und eine saure Aminosäure enthalten (Dice, 1990). Zytosolische HSC70-Chaperone erkennen solche Signalpeptide, entfalten die CMA-Substrate und docken mit Hilfe der Chaperone HSP40, Hip, Hop, Bag-1 und HSP90 an die Lysosomenmembran an (Massey et al., 2006). Das Andocken des Chaperonkomplexes wird über die C-terminale, zytosolische Domäne des Lysosomen-assoziierten Membranproteins (LAMP)-2A vermittelt. Vermutlich bildet dieses Protein durch Multimerisierung einen Translokationskanal für CMA-Substrate aus (Cuervo and Dice, 1996)

Ein vermehrter Abbau durch CMA wurde bei länger anhaltendem zellulären Stress beschrieben, während Makroautophagie eher die frühere Reaktion auf Stressfaktoren darstellt (Massey et al., 2006).

2.5.3 Mikroautophagie

Bei der Mikroautophagie stülpt sich die Lysosomenmembran, bzw. die Vakuolenmembran in Hefe, in das lysosomale Lumen und dirigiert auf diese Weise zytoplasmatische Bestandteile in einem sogenannten Autophagiekörperchen in den lysosomalen Degradationsweg (Munz, 2009). Im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Autophagieformen konnte eine Konservierung der Mikroautophagie in höheren Eukaryoten nicht gezeigt werden.

2.5.4 Beteiligung der Autophagie an der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen

Obwohl Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, hauptsächlich extrazellulären Ursprungs sind und über den (siehe Abschnitt „Präsentation auf MHC-Klasse-II Molekülen“) klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg generiert werden, gibt es immer mehr Evidenzen dafür, dass auch intrazellulär lokalisierte Antigene über den Prozess der Autophagie auf MHC-Klasse-II präsentiert werden können. Zytosolisch lokalisierte Proteine finden durch den Einschluss in Autophagosomen und

deren anschließender Fusion mit Lysosomen Anschluss an den endosomal/lysosomalen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg (Abbildung 2.3). So fusionierten in einer Studie an primären DCs und lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) über 50% der untersuchten MHC-II-Kompartimente mit Autophagosomen (Schmid et al., 2007). Überdies hinaus ergaben biochemische Analysen, dass 20-30% der auf MHC-Klasse-II präsentierten Peptide von zytosolischen und nukleären Proteinen abstammen (Chicz et al., 1993, Dongre et al., 2001, Dengjel et al., 2005). Auch Peptide des bekannten Autophagiesubstrats GAPDH sowie zweier Atg8 Homologe in Säugetieren, LC3 und GABARAP, wurden von humanen bzw. murinen MHC-Klasse-II-Molekülen isoliert (Dengjel et al., 2005, Suri et al., 2008, Aniento et al., 1993, Fengsrud et al., 2000). Für das zytosolische, bakterielle Modellantigen Neomycin-Phosphotransferase II (NeoR) wurde in LCL und einer Nierenzellkarzinomzelllinie gezeigt, dass die Inhibition der Makroautophagie durch 3-MA oder Wortmannin zu einer verminderten Präsentation des Antigens auf MHC-II führte. Die Präsentation von exogen zugesetztem NeoR-Protein auf MHC-Klasse-II wurde durch diese PI3K-Inhibitoren jedoch nicht beeinträchtigt. Die Behandlung mit den PI3K-Inhibitoren verhinderte, dass intrazellulär lokalisiertes NeoR in lysosomale Kompartimente gelangte, was ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Makroautophagie an der Einschleusung von NeoR in den lysosomalen Prozessierungsweg und der Präsentation des Antigens auf MHC-Klasse-II-Molekülen ist (Nimmerjahn et al., 2003).

Das erste virale Antigen, von dem eine Makroautophagie-abhängige Präsentation auf MHC-Klasse-II nachgewiesen wurde, ist das *nuclear antigen 1* (EBNA1) des Epstein-Barr-Virus.

EBNA1 wurde zum einen in Autophagosomen detektiert und seine Präsentation an EBNA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurde durch 3-MA-Behandlung oder siRNA-vermittelten *knock-down* von Atg12 inhibiert (Paludan et al., 2005, Munz et al., 2000).

Eine direkte Beteiligung der Makroautophagie an der Antigenpräsentation konnte durch die Fusionierung von Modellantigenen an Atg8/LC3 nachgewiesen werden. Die Fusionsproteine wurden ein Vielfaches besser auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert als die unfusionierten Antigene (Munz, 2009).

Neben Makroautophagie scheint auch Chaperon-vermittelte Autophagie zur Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen beizutragen. So wurden die beiden Autoantigene Glutamatdecarboxylase 65 und das *mutant human immunoglobulin kappa light chain* (SMA) nach Überexpression von LAMP2A effizienter auf MHC-Klasse-II präsentiert (Zhou et al., 2005). Dieser Präsentationsweg scheint

allerdings eine zytoplasmatische Prozessierung der Antigene vorauszusetzen, welche bislang für keine weiteren Antigene beobachtet wurde (Lich et al., 2000).

Dass der Autophagie-abhängige Präsentationsweg hohe biologische Relevanz besitzt, wurde durch Thymus-Transplantationsexperimente belegt. Erhielten Wildtyp-Mäuse Thymi von Atg5-defizienten Mäusen, so entwickelten diese Tiere Autoimmunerkrankheiten. Makroautophagie scheint somit für die Entstehung der zentralen Toleranz notwendig zu sein (Nedjic et al., 2008).

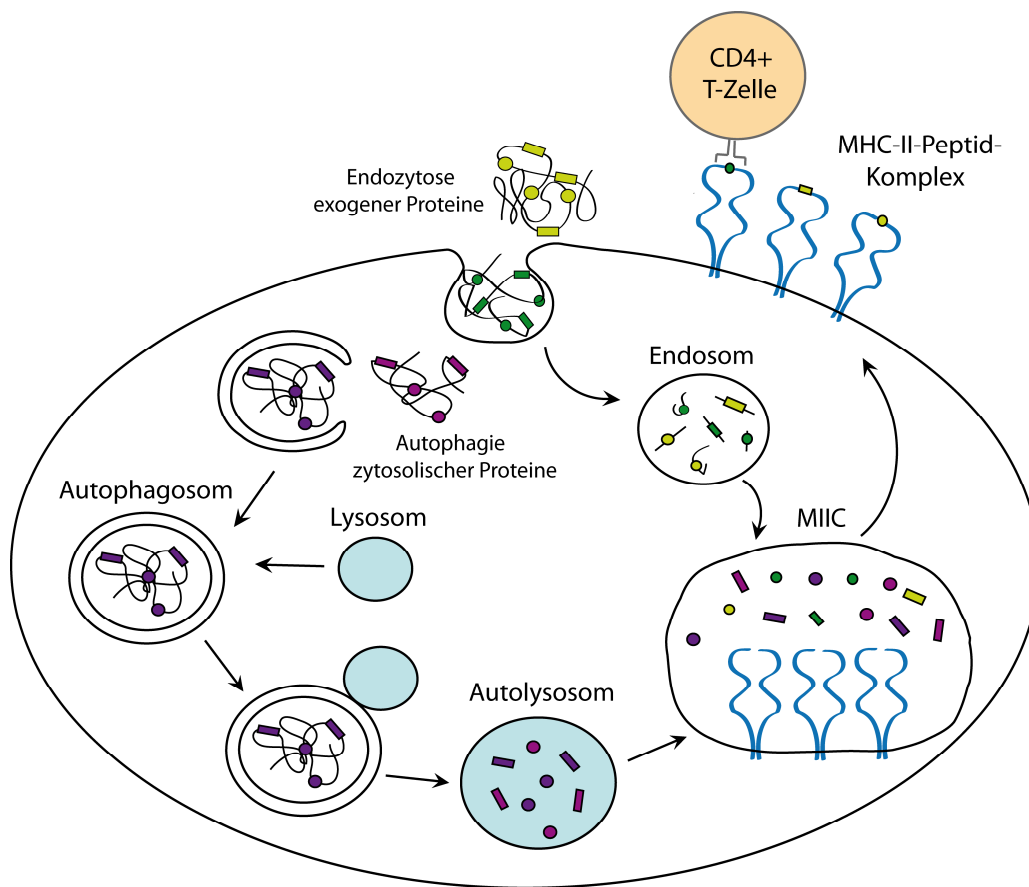


Abbildung 2.3: Autophagie-abhängige Präsentation zytosolischer Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen

Bei der Makroautophagie kommt es zum Einschluss von zytosolischen Proteinen durch eine Doppelmembran in Autophagosomen. Nach Fusion mit Endosomen/Lysosomen bauen lysosomale Proteasen die zytosolischen Proteine in den so generierten Autolysosomen ab. Die entstandenen Peptide werden anschließend im MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Die MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von CD4+ T-Zellen erkannt werden können.

2.5.5 Beteiligung der Autophagie an der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen

Neuere Arbeiten deuten auch auf eine Rolle der Makroautophagie bei der Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen hin. Ein Beispiel hierfür ist die Beobachtung, dass in späten Phasen der HSV-1 Infektion Autophagosomen von der äußeren Kernmembran um HSV-1 Partikel gebildet wurden und hierbei siRNA-vermittelter *knock-down* von Atg5 zu einer Inhibierung der HSV-spezifischen CD8+ T-Zell-Antwort führte. Interessanterweise war die Prozessierung zusätzlich abhängig von proteasomalem Abbau, was darauf schließen lässt, dass HSV-1 Antigene Autophagosomen entkommen und in zytosolische Abbauprozesse gelangen können (English et al., 2009).

Womöglich reguliert Makroautophagie die Präsentation von Antigenen an CD8+ T-Zellen auch über die Regulation der MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche. In B16 Melanomzellen führte die Stimulation von Makroautophagie zu einer verminderten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, während ihre Inhibierung den gegenteiligen Effekt zeigte. MHC-Klasse-I-Moleküle konnten darüber hinaus in Autophagosomen nachgewiesen werden, wobei die Behandlung durch IFN- γ den Zugang zu Autophagosomen verhinderte. Allerdings war die IFN- γ -vermittelte Hochregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch die Inhibierung von Makroautophagie beeinträchtigt. Dies lässt darauf schließen, dass unter Anwesenheit von IFN- γ Makroautophagie zu der Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen beiträgt (Li et al., 2010, Munz, 2010).

Makroautophagie leistet womöglich auch einen Beitrag zur Kreuzpräsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I. Antigene wurden beispielsweise von dendritischen Zellen effizienter kreuzpräsentiert, wenn die Antigen-liefernden Melanomzellen in der Lage waren, Makroautophagie durchzuführen (Li et al., 2008).

2.5.6 Makroautophagie als Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene

Makroautophagie selbst kann auch zur Beseitigung intrazellulärer Pathogene beitragen. (Long et al., 2008). So werden beispielsweise Gruppe A Streptokokken (GAS), welche durch das hämolytische Toxin Streptolysin O aus Endosomen in das Zytoplasma entkommen können (Jagannath et al., 2009), und vermutlich auch *Listeria monocytogenes* über die Autophagie-vermittelte Aufnahme in den endolysosomalen

Degradationsweg eliminiert (Leib et al., 2009). Auch Erreger in Phagosomen, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, können durch Fusion mit Autophagosomen beseitigt werden (Munz, 2009). Makroautophagie trägt in diesem Zusammenhang auch zur Bereitstellung bakterizider Substanzen in das Mycobakterium degradierende Kompartiment (Amphisomen, Autolysosomen) bei (Lee et al., 2010). Im Hinblick auf einen Schutz gegen Viren durch Makroautophagie während der angeborenen Immunantwort ist noch wenig bekannt. Obwohl während verschiedener viraler Infektionen, z.B. mit dem Parvovirus B19 (Oudard et al., 2009) oder dem Hepatitis C Virus (Martinet et al., 2007), eine Akkumulation von Autophagosomen zu beobachten ist, ist der Beitrag der Makroautophagie zur angeborenen Abwehr gegen diese Pathogene weitestgehend unbekannt. Herpes-simplex-Virus 1 Partikel können in Autophagosomen infizierter Zellen detektiert werden (Wenger et al., 2012). Auch führt die Überexpression von Beclin-1 in vivo zu einem Schutz gegen eine Sindbis-Virus Infektion (Szeto et al., 2006), während Atg5-Defizienz zu einer erhöhten Immunpathologie des Sindbis-Virus in Neuronen von Mäusen führte (Orvedahl et al., 2010).

Allerdings haben Viren auch Strategien entwickelt, der Autophagie-vermittelten Immunantwort zu entgehen. Beispielsweise exprimieren Vertreter aller vier Herpesvirussubfamilien Makroautophagieinhibitoren, deren primäres Ziel der Atg14L-enthaltende Beclin1-Komplex mit VPS34 ist. Das ICP-34.5-Protein von HSV-1 interagiert mit Beclin-1 und beeinträchtigt dadurch die Autophagosomenbildung (Orvedahl et al., 2007). KSHV (*Kaposi sarcoma associated herpesvirus*) kodiert für ein virales Bcl-2-Homolog (v-Bcl-2), welches mit einer höheren Affinität an Beclin-1 bindet als zelluläres Bcl-2. Diese Bindung verhindert die Integration von Beclin-1 in den Vps34-Komplex, möglicherweise durch die Verankerung an der ER-Membran (Pattingre et al., 2005). Auch das Bcl-2-Homolog des murinen γ -Herpesvirus-68 (MHV-68) interagiert mit Beclin-1 und verringert darüber die Autophagosomenbildung (Ku et al., 2008). Im Gegensatz zu den Herpesviren stabilisieren RNA-Viren Autophagosomen und verhindern deren Degradation (Munz, 2011). Eine Infektion mit dem Polio- oder Hepatitis-C-Virus führt zu einer Akkumulation von Autophagosomen, was sich positiv auf die Virusreplikation auswirkt (Ait-Goughoulte et al., 2008). Matrixprotein 2 (M2) des Influenza A Virus induziert ebenfalls eine Akkumulation von Autophagosomen und verhindert deren Fusion mit Lysosomen (Gannage et al., 2009). Influenza A Antigene werden somit auch nicht intrazellulär prozessiert und nicht auf MHC-Klasse-II an CD4+ T-Zellen präsentiert (Comber et al., 2011). Auch HIV blockiert die Maturierung von

Autophagosomen in Makrophagen, was mit einer vermehrten Virusreplikation einhergeht (Kyei et al., 2009).

2.5.7 Die molekulare Regulation von Autophagie durch TOR

Mangelzustände, Stress und reduzierte Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren alarmieren eukaryotische Zellen ihren Metabolismus anzupassen und so das Überleben der Zelle zu sichern. Eine frühe Reaktion auf diese Zustände ist die Inhibierung von Zellwachstum und die Induktion von Makroautophagie, welche die intrazellulären Nährstoffressourcen mobilisiert (Jung et al., 2010). Die Serin/Threonin-Protein-Kinase TOR (*target of rapamycin*) ist hierbei eine Schlüsselkomponente, welche unter Nährstoffmangel inhibiert wird und die Balance zwischen Wachstum und Autophagie reguliert. Entdeckt wurde TOR 1991 als Zielprotein von Rapamycin (Heitman et al., 1991). In Hefe wird die TOR-Aktivität über die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Stickstoff und Kohlenstoff, in Säugetierzellen wird mTOR (*mammalian target of rapamycin*) über Aminosäure- und Glucosespiegel reguliert. mTOR kommt in zwei verschiedenen Komplexen vor. mTORC1 (*mTOR complex 1*) besteht aus mTOR, Raptor, GßL/mLst8, PRAS40 und Deptor, während mTORC2 (*mTOR complex 2*) zusätzlich zu mTOR Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), GßL/mLst8, Sin1, PRR5/Protor und Deptor umfasst (Kim et al., 2002, Sarbassov et al., 2004, Jacinto et al., 2006, Vander Haar et al., 2007, Jung et al., 2010). Raptor, die zentrale Komponente des mTORC1, ist der Hauptregulator von Translation und Ribosomenbiogenese und verantwortlich für die Induktion von Autophagie unter Nährstoff- und Energiemangelzuständen. Bei einem erhöhten Verhältnis von AMP/ATP schaltet AMPK (*AMP-activated protein kinase*) ATP-benötigende Prozesse ab, während sie ATP-generierende, katabolische Prozesse aktiviert. Dies geschieht über die Phosphorylierung von Raptor, was zu einer Inhibierung von mTOR führt. Die Folge ist die Induktion von Autophagie und die Unterdrückung von Proteinsynthese und Zellproliferation (Rikiishi, 2012). mTORC2 ist beteiligt an der Regulation der Phosphorylierung von Akt/PKB, Protein Kinase C, Serum- und Glucocorticoid-Proteinkinase 1 (Sarbassov et al., 2005, Garcia-Martinez and Alessi, 2008). Da Akt den mTOR Repressor TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) phosphoryliert und somit auch ein positiver Regulator von mTORC1 ist, wird angenommen, dass auch mTORC2 ein negativer Regulator von Autophagie ist. Tatsächlich führte die Inhibierung von mTORC2 zur Induktion von Autophagie in Skelettmuskelzellen (Mammucari et al., 2007, Zhao et al., 2007).

Die Regulation von Autophagie durch TOR wird in Hefe durch Atg1 vermittelt. Hinweise hierfür lieferten Versuche, in denen Atg1-/- Mutanten einen Defekt in dem Autophagieprozess zeigten, auch dann, wenn TOR inhibiert wurde oder Nährstoffmangel herrschte (Matsuura et al., 1997, Kamada et al., 2000).

TOR phosphoryliert Atg13, welches für die Atg1 Aktivität benötigt wird. Dies führt zu einer verringerten Affinität zwischen Atg1 und seinen bindenden Proteinen und somit zu einer Unterdrückung von Autophagie (Kamada et al., 2000). Unter Mangelzuständen, in denen TOR inaktiv ist, liegt Atg13 hypophosphoryliert vor und induziert die Bildung von präautophagosomalen Strukturen (Kamada et al., 2010).

Das Atg1-Homolog in Säugetierzellen ist ULK (*UNC-51 like kinase*). ULK1, ULK2 und Atg13 werden durch mTORC1 phosphoryliert (Jung et al., 2009, Ganley et al., 2009, Hosokawa et al., 2009). FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*) interagiert mit ULK1 und ULK2 und ist notwendig für die Autophagosomenbildung (Hara et al., 2008). Die Bindung von FIP200 an ULK über Atg13 wird für die Phosphorylierung von FIP200 durch ULK benötigt (Jung et al., 2009). Es wird angenommen, dass es sich bei FIP200 um das Homolog von Atg17 in Säugetierzellen handelt.

ULK1 und ULK2 sind an der Autophagosomenmembran lokalisiert und bei der Autophagosomenbildung involviert (Hara et al., 2008). Die Nukleierung beinhaltet die Bildung eines PI(3)P-angereicherten Membrankompartiments, welches vermutlich vom ER abstammt (Axe et al., 2008, Hayashi-Nishino et al., 2009). Der hVps34-Komplex, welcher Atg14L und Beclin-1 enthält, ist vermutlich verantwortlich für die Bildung von PI(3)P in der frühen Phase der Nukleierung, in der weitere Faktoren rekrutiert werden (Matsunaga et al., 2009). Noch nicht ganz geklärt ist die Verbindung zwischen ULK1/2 und hVps34. Es könnte sein, dass der ULK1-Komplex vor den Atg14L-hVps34-Komplex geschaltet ist und die Aktivität von hVps34 reguliert. Auch ist eine parallele, unabhängige Regulation von Autophagie durch die beiden Komplexe denkbar (Jung et al., 2010).

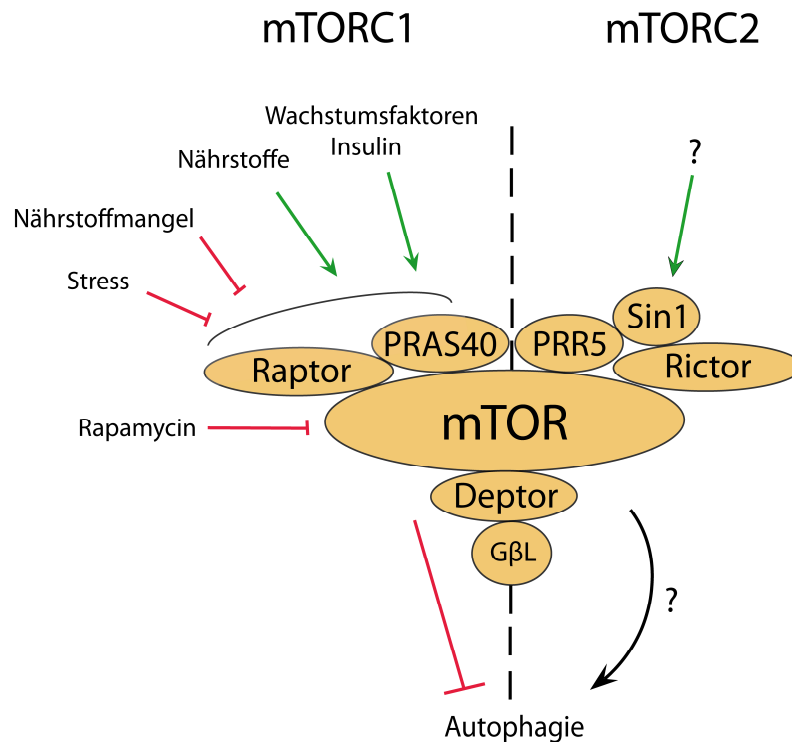


Abbildung 2.4: Die Regulation von Autophagie durch mTOR

mTOR kommt zusammen mit Deptor und GβL in zwei verschiedenen Komplexen vor: Im Komplex mit Raptor und PRAS40 bildet mTOR den mTOR-Komplex 1 (mTORC1). mTOR ist hierbei unter nährstoffreichen Zuständen aktiv, durch Nährstoffmangel, Stress oder Rapamycin wird mTOR jedoch inhibiert. Da mTOR in diesem Komplex Autophagie unterdrückt, wird unter Nährstoffmangel und Stress Autophagie induziert. Im Komplex mit Rictor, PRR5 und Sin1 bildet mTOR den mTOR-Komplex 2 (mTORC2). Inwieweit mTORC2 Autophagie reguliert, ist noch nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass mTORC2 auch zur Inhibition von Autophagie beiträgt (verändert nach Jung et al., 2010).

2.5.8 Autophagie und Apoptose

Programmierter Zelltod kann in Typ-I (Apoptose) und Typ-II (autophagischer Zelltod) untergliedert werden.

Apoptose ist das Resultat von Caspase-vermittelter Zerstörung der Zelle (Logue and Martin, 2008). Sie kann durch extrinsische und intrinsische Signalwege ausgelöst werden. Der extrinsische Weg wird beispielsweise durch die Bindung von FasL an den Todesrezeptor Fas ausgelöst, der intrinsische Weg durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und der damit verbundenen Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma (Pizzo and Pozzan, 2007). Autophagie ist selbst wahrscheinlich kein Vermittler von Zelltod, wird aber vermutlich in Kombination mit anderen Signalen für einen programmierten Zelltod benötigt.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Maschinerien für Apoptose, Autophagie und Nekrose miteinander interagieren. So führt z.B. die Eliminierung von geschädigten Mitochondrien durch Autophagie zu einer geringeren Freisetzung von proapoptotischen Substanzen aus den Mitochondrien. Findet keine Autophagie statt, führt die Freisetzung von Cytochrom c und AIF (*apoptosis inducing factor*) zu Apoptose, im Falle einer starken Schädigung und ATP-Depletion zu nekrotischem Zelltod (Rikiishi, 2012). Autophagie-assoziierte Proteine können ebenfalls eine Rolle bei der Apoptose spielen. So haben z.B. niedrige Mengen an Atg5-Spaltprodukten signifikante Auswirkungen auf Apoptose, nicht aber das intakte Atg5-Protein selbst, welches in dem Autophagie-Prozess eine wichtige Rolle spielt (Yousefi et al., 2006). Die BH3-Domäne von Beclin-1 kann durch Bcl-2 und Bcl-XL gebunden werden, wodurch Autophagie inhibiert wird. Diese Interaktion kann durch Phosphorylierung von Bcl-2 oder Beclin-1, bzw. Ubiquitylierung von Beclin-1, unterbunden werden (Kang et al., 2011). Die Bindung von Beclin-1 an Bcl-2 neutralisiert hingegen nicht die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 (Ciechomska et al., 2009). Beclin-1 kann durch Caspasen während des apoptotischen Prozesses gespalten werden, so dass die proautophagische Aktivität von Beclin-1 verloren geht (Djavaheri-Mergny et al., 2010, Hou et al., 2010). Zusätzlich sensibilisieren die C-terminalen Fragmente von Beclin-1 die Zellen für apoptotische Signale (Djavaheri-Mergny et al., 2010). Es gibt Hinweise darauf, dass aktive Caspase-8 durch Autophagie abgebaut werden kann (Hou et al., 2010), was darauf hindeutet, dass ein Rückkopplungsmechanismus existiert, der Autophagie und Apoptose kreuzreguliert.

Über dies hinaus wurde gezeigt, dass Beclin-1 ein Substrat der proapoptotischen DAP-Kinase (*death-associated protein kinase*) ist, was einen weiteren Mechanismus zur Induktion von Autophagie darstellt (Zalckvar et al., 2009).

2.6 Fragestellung

In der Arbeit von Riedel bzw. Nimmerjahn und Kollegen (Nimmerjahn et al., 2003, Riedel et al., 2008) wurde für das Modellantigen NeoR und seine nukleäre Variante NucNeoR eine Autophagie-abhängige Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen gezeigt. Der Nachweis der Beteiligung von Autophagie bei der endogenen Antigenpräsentation auf MHC-II erfolgte hierbei durch den Einsatz chemischer Inhibitoren, die mit Autophagie oder dem endolysosomalen Degradationsweg interferieren. Um nähere Einblicke in Regulation und Mechanismus der endogenen Antigenpräsentation zu erhalten, sollten in dieser Arbeit die experimentellen

Grundlagen für die Charakterisierung dieses Präsentationsweges auf genetischer Ebene erarbeitet werden. Dazu sollte durch die konditionale, zeitlich getrennte Modulation von Makroautophagie und der Expression von Modellantigenen eine Beteiligung verschiedener Autophagie-assoziiierter Gene an der endogenen Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-II untersucht werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob hierbei Antigene selektiv in Autophagosomen dirigiert werden und die Autophagie-assoziierte Antigenpräsentation eine Ubiquitylierung von Komponenten des Präsentationsweges oder des Antigens selbst voraussetzt.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Tabelle 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Erythromycin	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Everolimus	LC Laboratories
Glycerin	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
3-Methyladenin (3MA)	Sigma-Aldrich
MG132	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phytohämagglutinin (PHA)	Oxoid
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich
Rapamycin	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck
Triton X-100	Merck

Chemikalie	Hersteller
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Qualität p.A. eingesetzt. Nicht erwähnte Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, oder Roth verwendet. Weitere Reagenzien wurden von den Firmen Becton-Dickinson (BD), Bio-Rad, GE Healthcare, Integra, Invitrogen, MBI-Fermentas, Millipore, New England Biolabs, Neolab, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche und Stratagene bezogen.

3.2 Geräte

Tabelle 3.2: Geräte

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsanlage	Gammacell 40 der Firma AECL mit Cäsium-137 (γ-Strahler)
Brutschrank	Sanyo Mco-17-AI
ELISA-Lesegerät	Tecan
LSR Fortessa	Becton Dickinson
FACS Calibur	Becton Dickinson
Falcon-Roller	Coulter Electronics Limited
Gefrierschrank -80°C	Colora bzw. Thermo
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop / Axioskop	Zeiss
Millipore-Anlage	Millipore
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät	Knick
Pipetten	Gilson und Rainin
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific
Spektrophotometer	Eppendorf
Sterilbank	BDK
UV-Transluminator	UVP Inc.
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wallac 1420 multilabel counter Victor2	Perkin Elmer

Gerät	Hersteller
Zentrifugen	Beckman, Eppendorf, Hettich, Sorvall und Thermo

3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
AIM-V	Invitrogen
Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filter-Einheiten	Millipore
DMEM	Gibco BRL
ELISA-Platten	Corning Incorporated
<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) Development System Human GM-CSF Human IFN γ	R&D Systems
Filter 0,45 und 0,22 μ m	Millipore
Fötales Kälberserum; FCS (<i>fetal calf serum</i>)	PAA
Fungizone, Amphotericin 250 μ g/ml	Gibco BRL
Gentamycin	Gibco BRL
HEPES 1 M	Gibco BRL
Humanes Serum	Aus peripherem Blut freiwilliger humaner Spender
L-Glutamin, 200 mM	Gibco BRL
Lochplatten	Nunc
Gestopfte Pipettenspitzen	ART Molecular Bio Products
MACS-Separationssäulen LS	Miltenyi Biotec
Neon-Transfektionskit	Invitrogen
Natrium-Heparin	Braun
Natriumpyruvat	Gibco BRL
Nicht-essentielle Aminosäuren (NE AA)	Gibco BRL
Optimem	Gibco BRL
Parafilm „M“	American National Can
Pancoll	Pan Biotech
Polystyren-Zellkulturschalen	BD-Falcon
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	BD-Falcon und Sarstedt
RPMI 1640	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Vectashield Einbettmedium mit DAPI	Vector laboratories

Material	Firma
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	BD-Falcon
Zellkulturschalen	Nunc

Nicht aufgeführte Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Falcon, Nunc, BD, Sarstedt und Greiner bezogen.

3.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 3.4: Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS	154 mM NaCl pH 7,4 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20
TBS	50 mM Tris pH 8 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
TBS-T	TBS 0,05 % Tween-20

Puffer oder Lösungen, die nur bei einer bestimmten Methode zur Anwendung kamen, werden bei der entsprechenden Methode beschrieben. Sämtliche Chemikalien, die für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden, wurden von Merck, Fluka, Roth, oder Sigma in Analysequalität bezogen.

3.5 Zellkulturmedien

Tabelle 3.5: Zellkulturmedien

Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
RPMI 1640-Komplettmedium/ LCL-Medium	RPMI 1640 10 % FCS 1 % Fungizone (Amphotericin) 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1 % nicht-essentielle Aminosäuren

DMEM-Komplettmedium	DMEM 10 % FCS 1 % Fungizone (Amphotericin) 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin
T-Zell-Medium (+/- Interleukin (IL)-2)	AIM-V 10 % humanes, gepooltes Serum (hitzeinaktiviert) 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES optional 10 U/ml IL-2
Waschmedium	RPMI 1640-Medium ohne Zusätze

3.6 Zelllinien

3.6.1 Lymphoblastoide Zelllinien

Lymphoblastoide Zelllinien (*lymphoblastoid cell lines*, LCL) sind in vitro durch EBV transformierte humane B-Zellen. LCL Z(-) wurden mit einer BZLF1-Deletionsmutante (B95.8 Δ BZLF1) von EBV generiert und können daher keine lytischen Genprodukte exprimieren und somit auch keine Virionen produzieren.

B95.8 ist eine durch EBV-Infektion von B-Zellen aus Krallenaffen entstandene B-Zelllinie.

Tabelle 3.6: Verwendete LCL und LCL Z(-) und deren HLA-Genotypen

Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DPB1*	HLA-DRB3*/4*/5*
LCL 1.11	0201, 6601	1801, 4102	1203, 1701	1303, 1501	0301, 0602	0301, 0402	DRB3*0101, DRB5*0101
LCL GB	0101	1501	0304, 0602	1101, 1301	0301, 0603	0401, 0402	DRB3*0202
LCL JM, LCL Z(-) JM	0201, 0301	1529, 5101	1203, 1402	0801, 1301	0402, 0603	0401, 1301	DRB3* 01011

3.6.2 Burkitt-Lymphom Zelllinien

DG75 und Raji sind Burkitt-Lymphom Zelllinien, wobei DG75 EBV-negativ und Raji EBV-positiv ist. Allerdings weist die letztere Zelllinie eine Deletion im Virusgenom auf, weswegen keine Viruspartikel gebildet und freigesetzt werden.

Tabelle 3.7: Verwendete Burkitt-Lymphom Zelllinien und deren HLA-Genotypen

Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DPB1*	HLA-DRB3*/4*/5*
DG75	0201, 6601	4101, 5001	0602, 1701	0404, 1301	0402, 0603	0401	DRB3*0101, DRB4*0103
Raji	0301	1510	0304, 0401	0301, 1001	0201, 0501	0101	DRB3*0202

3.6.3 Adhärent wachsende Epithelzelllinien

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T ist eine Zelllinie, die durch die Einführung der Gene E1a und E1b des Adenovirus Typ 5 transformiert wurde und zusätzlich das *large T antigen* von SV40 exprimiert.

3.6.4 T-Zellen

3.6.4.1 T-Zellklone

Tabelle 3.8: T-Zellklone

T-Zellklon	Spezifität	HLA-Restriktion	Epitop
20-4/A4	NeoR	HLA-DPB1*0301	AA216-229 -DRYQDIALATRDIA-
GB3C 3H10	EBNA3C	HLA-DRB1*1101	AA627-640 -VVRMFMRERQLPQS-
SLE3C	EBNA3C	HLA-DQB1*0501	AA387-400 -SDDELPYIDPNMEPV-
Gp1D6	gp350	HLA-DRB1*1301	AA65-79 -FGQLTPHTKAVYQPR-
GB-BRLF1-1H3	BRLF1	HLA-DRB1*1301	AA468-486-APTPTGPVHEPVGSLTPAP-

3.6.4.2 T-Zelllinien

Tabelle 3.9: T-Zelllinien

T-Zelllinie	Spezifität	HLA-Restriktion	Epitop
R	BRLF1	HLA-A2	AA ₁₀₉₋₁₁₇ -YVLDHLIVV-

3.7 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm XL1-*blue* MRF⁺ (Stratagene) verwendet.

3.8 Oligonukleotide für die Klonierung von shRNAs

Tabelle 3.10: Oligonukleotide für die Klonierung von shRNAs

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
shLuciferase sense	TGC TGC TGG AGA GCA ACT GCA TAA GCG AAC TTA TGC AGT TGC TCT CCA GC
shLuciferase anti	CCT GGC TGG AGA GCA ACT GCA TAA GTT CGC TTA TGC AGT TGC TCT CCA CC
shRaptor-1 sense	TGC TGG AGT CCG AAA TGC TGC AAT CCG AAG ATT GCA GCA TTT CGC ACT CC
shRaptor-1 anti	CCT GGG AGT CCG AAA TGC TGC AAT CTT CGG ATT GCA GCA TTT CGG ACT CC
shRaptor-2 sense	TGC TGG ATG AAG GAT CGG ATG AAG ACG AAT CTT CAT CCG ATC CTT CAT CC
shRaptor-2 anti	CCT GGG ATG AAG GAT CGG ATG AAG ATT CGT CTT CAT CCG ATC CTT CAT CC
shRictor-1 sense	TGC TGC TAC GAG CGC TTC GAT ATC TCG AAA GAT ATC GAA GCG CTC GTA GC
shRictor-1 anti	CCT GGC TAC GAG CGC TTC GAT ATC TTT CGA GAT ATC GAA GCG CTC GTA GC
shRictor-2 sense	TGC TGC GAG CTG ATG TAG AAT TAG ACG AAT CTA ATT CTA CAT CAG CTC GC
shRictor-2 anti	CCT GGC GAG CTG ATG TAG AAT TAG ATT CGT CTA ATT CTA CAT CAG CTC GC
shp62-1 sense	TGC TGC ATC AGC ACT TTA ACC AAT GCG AAC ATT GGT TAA AGT GCT GAT GC
shp62-1 anti	CCT GGC ATC AGC ACT TTA ACC AAT GTT CGC ATT GGT TAA AGT GCT GAT GC
shp62-2 sense	TGC TGG TTA GCA AGA CAA AGC AAA TCG AAA TTT GCT TTG TCT TGC TAA CC

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
shp62-2 anti	CCT GGG TTA GCA AGA CAA AGC AAA TTT CGA TTT GCT TTG TCT TGC TAA CC

3.9 Plasmide

Tabelle 3.11: Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Resistenz	Referenz
pRTR-V-Tet-Ery-EBNA3C	EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-Atg5-Ery-EBNA3C	Atg5 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-dnAtg5-Ery-EBNA3C	dnAtg5 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-Ubiquitin-Ery-EBNA3C	Ubiquitin unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-UbK48R-Ery-EBNA3C	UbK48R unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-UbK63R-Ery-EBNA3C	UbK63R unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C	shLuc unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shBeclin-1-Ery-EBNA3C	shBeclin-1 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shp62-Ery-EBNA3C	shp62 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shRaptor-Ery-EBNA3C	shRaptor unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shRictor-Ery-EBNA3C	shRictor unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-Ery-BRLF1	BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-Ubiquitin-Ery-BRLF1	Ubiquitin unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-UbK48R-Ery-BRLF1	UbK48R unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-UbK63R-Ery-BRLF1	UbK63R unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit

Plasmid	Eigenschaft	Resistenz	Referenz
pRTR-V-Tet-UbK1-7-Ery-BRLF1	UbK1-7 unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shLuc-Ery-BRLF1	shLuc unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shBeclin-1-Ery-BRLF1	shBeclin-1 unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-shp62-Ery-BRLF1	shp62 unter Tet-Promotor, BRLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTR-V-Tet-Ery-NucNeoR	Nukleäre Variante von NeoR unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pRTS-EBNA3C	EBNA3C unter Tet-Promotor	Amp ^R	A. Riedel
pCMV-Ubiquitin	Ubiquitin-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK48R	UbK48R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK63R	UbK63R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK1-7	UbK1-7-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK6R	UbK6R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK11R	UbK11R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK27R	UbK27R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK29R	UbK29R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-UbK33R	UbK33R-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BRLF1-EHis	BRLF1-Expressionsplasmid	Amp ^R	Adhikary et al., 2007
pCMV-Beclin-1-complete	Beclin-1-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-Raptor-His	Raptor-His-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-WT-SDD	BZLF1-WT-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-C1-5-SDD	BZLF1-C1-5-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-K1-9-SDD	BZLF1-K1-9-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-KC-SDD	BZLF1-KC-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-S1-15-SDD	BZLF1-S1-15-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-T1-12-SDD	BZLF1-T1-12-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-M1-SDD	BZLF1-M1-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-M2-SDD	BZLF1-M2-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-M3-SDD	BZLF1-M3-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit

Plasmid	Eigenschaft	Resistenz	Referenz
pCMV-BZLF1-M4-SDD	BZLF1-M4-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-WT-DDE-YVL	BZLF1-WT-DDE-YVL-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-BZLF1-VM-DDE-YVL	BZLF1-VM-DDE-YVL-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-MART1-WT-SDD	MART1-WT-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-MART1-M1-SDD	MART1-M1-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-MART1-M2-SDD	MART1-M2-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-MART1-M3-SDD	MART1-M3-SDD-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-MART1-WT-DDE-YVL	MART1-WT-DDE-YVL-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-MART1-VM-DDE-YVL	MART1-VM-DDE-YVL-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-NeoR-GFP	NeoR-GFP-Expressionsplasmid	Amp ^R	Nimmerjahn et al., 2003
pCMV-NucNeoR-GFP	NucNeoR-GFP-Expressionsplasmid	Amp ^R	Nimmerjahn et al., 2003
pCMV-Nuc-mutNeoR- GFP	Nuc-mutNeoR- GFP-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
pCMV-Ngfr-LMP2131	Ngfr-Expressionsplasmid	Amp ^R	AG Mautner
pHL2823	GFP-Expressionsplasmid	Amp ^R	Prof. G. Hobom, Gießen
pHL-dsRed-2823	dsRed-Expressionsplasmid	Amp ^R	AG Mautner
Pinco	GFP-Expressionsplasmid	Amp ^R	Nimmerjahn et al., 2003
Pinco-NeoR	NeoR-Expressionsplasmid	Amp ^R	Nimmerjahn et al., 2003
Pinco-NucNeoR	NucNeoR-Expressionsplasmid	Amp ^R	Nimmerjahn et al., 2003
Pinco-Nuc-mutNeoR	Nuc-mutNeoR-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Pinco-RARN-NeoR	RARN-NeoR-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Pinco-KAKN-NeoR	KAKN-NeoR-Expressionsplasmid	Amp ^R	vorliegende Arbeit

Amp^R = Ampicillin-Resistenz

3.10 DNA-modifizierende Enzyme

Die DNA-modifizierenden Enzyme CIP (*calf intestinal phosphatase*), T4-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase sowie alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von New England Biolabs und MBI Fermentas bezogen.

3.11 Antikörper

3.11.1 Primärantikörper

Tabelle 3.12: Primärantikörper

Spezifität	Spezies	Anwendung	Hersteller
Aktin	Maus	WB	Santa Cruz Biotechnology
Atg5	Kaninchen	WB	BD-Pharmingen
Beclin-1	Maus	WB	BD-Pharmingen
BRLF1	Maus	WB	Argene
EBNA3C	Maus	WB	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von E. Kremmer (HMGU, München)
GAPDH	Maus	WB	Millipore
GFP	Maus	WB	Santa Cruz Biotechnology
6xHis	Maus	WB	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von E. Kremmer (HMGU, München)
HLA-DR, DP, DQ (FITC-markiert)	Maus (IgG2a)	FACS	BD Pharmingen
HLA-Klasse I (PE-markiert)	Maus (IgG2a)		Sigma
Myc	Maus	WB	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von E. Kremmer (HMGU, München)
NGF-R	Maus	MACS	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von E. Kremmer (HMGU, München)
p62	Maus	WB	Santa Cruz Biotechnology
Raptor	Maus	WB	Santa Cruz Biotechnology
Rictor	Maus	WB	Santa Cruz Biotechnology
Tubulin	Ratte	WB	Abcam

WB = Western Blot; MACS = magnetische Zellsortierung

3.11.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.13: Sekundärantikörper

Spezifität	Spezies	Kopplung	Anwendung	Hersteller
Maus-IgG	Schaf	HRP	WB	Amersham
Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	WB	Jackson
Ratte IgG + IgM	Ziege	HRP	WB	Jackson

HRP = Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*)

3.12 Zytokine

Tabelle 3.14: Zytokine

Zytokin	Konzentration	Hersteller
Humanes IL-2 (Proleukin)	1.000.000 U/ml in PBS	Chiron-Novartis

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Allgemeine Anmerkungen

Um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden, wurden alle Schritte im Umgang und der Kultivierung von lebenden Zellen unter einer sterilen Werkbank und unter Verwendung autoklavierter bzw. steriler Materialien durchgeführt.

4.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Vorbereitung für die Kryokonservierung wurden die Zellen bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und jeweils 1×10^7 Zellen in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend in Papiertücher eingepackt, um ein schnelles Einfrieren zu verhindern, und bei -80°C eingefroren. Nach einigen Tagen wurden die Röhrchen zur Kryokonservierung in Tanks mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte durch rasches Erwärmen der Kryoröhrchen und sofortiges Überführen in RPMI-Komplettmedium. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen bei 500 x g 5 min abzentrifugiert, der Kulturüberstand abgesaugt und einmal mit RPMI-Medium gewaschen. Nach Aufnahme des Zellsediments in das entsprechende Kulturmedium wurden sie in Zellkulturflächen oder Kulturplatten für die Kultivierung überführt.

Einfriermedium: 90 % FCS; 10 % DMSO

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 μl aus einer homogenen Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau 1:1 verdünnt. Hiervon wurden 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da Trypanblau tote Zellen anfärbt, können diese von lebenden Zellen unter dem Durchlichtmikroskop unterschieden werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle vier Großquadranten ausgezählt und der Mittelwert pro Quadrant gebildet. Die Gesamtzellzahl ließ sich mit folgender Formel berechnen:

Gesamtzellzahl = Mittelwert aus der Anzahl der Großquadranten x Verdünnungsfaktor x 10^4 x Volumen in ml

4.1.4 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden in einem Zellkulturinkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zellkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nicht länger als drei Monate benutzt. Serum wurde bei -20°C, die anderen Zusätze entsprechend den Herstellerangaben gelagert.

4.1.4.1 Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Die humane, embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurde in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 14 cm in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Durch Abnehmen des Mediums, Zugabe von 10 ml Trypsin-EDTA und Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml DMEM-Komplettmedium verdünnt und in einem 50 ml Spitzbodenröhrchen zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in DMEM-Komplettmedium aufgenommen und 1/10 dieser Suspension in 40 ml in einer neuen Zellkulturschale ausgebracht. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurde dies alle 3-4 Tage wiederholt.

4.1.4.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Suspensionszelllinien (LCL, LCL Z(-) und BL-Zelllinien) wurden in RPMI 1640-Komplettmedium kultiviert. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese in Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Bedarf alle 3 bis 4 Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 (Zellsuspension zu frischem Medium) geteilt.

4.1.4.3 Restimulation und Kultivierung von etablierten T-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellklone wurden in 24-Lochplatten in T-Zell-Medium mit 10 U/ml IL-2 und 10 µg/ml Ciprofloxacin kultiviert. Alle 14 Tage wurden die T-Zellen mit humanen, bestrahlten (40 Gray), mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMC) als *feeder*-Zellen, welche aus Vollblut oder *buffy coats* von mindestens 2 verschiedenen Spendern gewonnen worden waren, sowie bestrahlten (80 Gray) autologen LCL als antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) in T-Zellstimulationsmedium restimuliert. Die APC wurden 24-48

h zuvor mit dem für die jeweiligen T-Zellen spezifischen Protein (500 ng/ml) oder Viruskonzentrat, bzw. 2 h vor Restimulation mit spezifischem Peptid (2 µg/ml) beladen. Die APC wurden vor Einsatz zur T-Zellstimulation mindestens dreimal gewaschen, um Verschleppung von Protein bzw. Peptid zu vermeiden. Für die Stimulation wurden in 2 ml 1×10^6 T-Zellen mit 5×10^5 der entsprechenden LCL und 1×10^6 feeder-Zellen pro Loch einer 24 Lochplatte ausgebracht. Nach 3-4 Tagen wurde ca. 3/4 des Mediums entfernt und durch frisches T-Zellmedium mit 10 U/ml IL-2 und 10 µg/ml Ciprofloxacin ersetzt.

T-Zelllinien wurden ebenfalls 14-tägig restimuliert, allerdings nur in T-Zell-Medium mit Ciprofloxacin und den entsprechenden bestrahlten (80 Gray) LCL als antigen-präsentierenden Zellen. 24 h später und darauf folgend alle 3 Tage wurde den Zellen 10 U/ml IL-2 zugesetzt.

T-Zellstimulationsmedium: T-Zellmedium; 10 U/ml IL-2; 250 ng/ml PHA; 10 µg/ml Ciprofloxacin

4.1.5 Isolierung peripherer mononuklearer Zellen aus Vollblut durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Für die Gewinnung von PBMC aus gesunden Spendern wurde venöses Blut entnommen und die Koagulation durch EDTA (Endkonzentration 1,5 mM) verhindert. Alternativ zu frischem peripherem Blut wurden *buffy coats* als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von PBMC verwendet. Untersuchungen an humanem Material wurden nach Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München durchgeführt. Für die Isolierung der PBMC wurden 35 ml einer 1:1-Verdünnung aus *buffy coats* und RPMI-Medium bzw. unverdünntem Vollblut in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 15 ml einer Ficoll-Lösung (Pancoll; Pan) unterschichtet. Nach einer Zentrifugation mit $750 \times g$ für 30 Minuten, ohne Verwendung der Zentrifugenbremse, sammelten sich die PBMC oberhalb der Ficoll-Lösung in einem Ring und konnten von den Erythrozyten und weiteren Blutbestandteilen durch Absaugen getrennt werden. Die PBMC wurden nachfolgend dreimal mit RPMI 1640-Medium gewaschen (Zentrifugation mit $500 \times g$ für 10 min), in RPMI 1640-Medium aufgenommen, gezählt und nach Bedarf weiterverarbeitet.

4.1.6 Herstellung von Viruskonzentrat

Zur Herstellung von Viruskonzentrat wurden Zellen der Krallenaffen-Zelllinie B95.8 in hoher Zelldichte über mehrere Tage kultiviert, der Überstand anschließend gesammelt und in einer Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filter-Einheit für 15-20 min bei 1000 x g auf ein Zehntel des Ausgangsvolumen eingengt. Gelagert wurde das Viruskonzentrat bei -80°C.

4.1.7 Transfektion von HEK293T-Zellen mit Polyethylenimin

Für die Transfektion von 70-80% konfluenten HEK293T-Zellen wurde ein Transfektions-Mix, wie in Tabelle 4.1 beschrieben, hergestellt. Hierzu wurde als erstes OPTIMEM mit dem zu transfizierenden Plasmid versetzt und gemischt. Anschließend wurde eine Polyethylenimin (PEI)-Lösung hinzugegeben und das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wurde anschließend mit dem entsprechenden Volumen an DMEM-Komplettmedium gemischt und nach Entfernen des Kulturmediums vorsichtig auf die HEK293T-Zellen gegeben. Nach 12 h wurde der Transfektions-Mix wieder entfernt und durch DMEM-Komplettmedium ersetzt.

Tabelle 4.1: Transfektions-Mix für die Transfektion von HEK293T-Zellen eines Lochs einer 6-Loch-Platte

OPTIMEM	250 µl
Plasmid-DNA	7,5 µg
PEI-Lösung	11,25 µl
Inkubation	15 min bei RT
Medium nach Inkubation	5 ml

PEI-Lösung: 1 mg/ml PEI in H₂O, pH 7,0

4.1.8 Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation

4.1.8.1 Transfektion von Suspensionszellen mit dem GenePulser II von BioRad

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen 1:1 geteilt und mit frischem RPMI 1640-Komplettmedium aufgefüllt, um eine logarithmische Wachstumsphase zu erreichen. Am darauffolgenden Tag wurden 1×10^7 Zellen für 5 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Waschmedium resuspendiert. Nach

erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml OPTIMEM resuspendiert und nochmals für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 300 µl OPTIMEM aufgenommen, in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Spaltbreite) überführt und mit 20 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA versetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 230 V und 975 µF mittels GenePulser II elektroporiert. Die Zellen wurden umgehend in 1 ml FCS aufgenommen und in eine mit 10 ml RPMI 1640-Komplettmedium vorbereitete Kulturflasche überführt.

4.1.8.2 Transfektion von Suspensionszellen mittels NEON-Technologie (Invitrogen)

Zellen in logarithmischer Wachstumsphase wurden 5 min bei 500 x g zentrifugiert und das Kulturmedium verworfen. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und 1×10^6 Zellen in 100 µl Puffer R aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 20 µg der gewünschten Plasmid-DNA versetzt. In die Pipettenstation wurden 3 ml Puffer E2 gefüllt. Die Zell-DNA-Suspension wurde mit der Neon-Pipette aufgezogen, in die Station gestellt und mit 2 Pulsen von je 30 ms bei 1100 V elektroporiert. Die Zellen wurden danach in ein Loch einer 24-Lochplatte mit 2 ml vorgewärmtem RPMI 1640-Komplettmedium (ohne Antibiotika) überführt. Die Zellen wurden ÜN bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und am nächsten Tag in frisches RPMI 1640-Komplettmedium (mit Antibiotika) überführt.

4.1.9 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS) wurde durchgeführt, um den Anteil an transfizierten Zellen zu erhöhen. Dabei wurden 1×10^7 Zellen, die durch Kotransfektion mit einem Expressionsplasmid für den extrazellulären Teil des NGF-Rezeptors (*nerve growth factor receptor*, NGF-R) auf ihrer Oberfläche exprimierten, 48 h nach Transfektion mittels MACS angereichert. Die Zellen wurden hierzu geerntet und für 5 min bei 500 x g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in Waschmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in 300 µl Waschmedium aufgenommen, mit 100 µl anti-NGFR-Antikörper versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml eiskalter MACS-Puffer zugegeben und die Zellen für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst komplett entfernt und 1×10^7 Zellen in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert, mit 20 µl Ziege-anti-Maus-IgG MicroBeads versetzt und erneut für 15 min auf Eis inkubiert, wonach die Zellen erneut mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen wurden. Nach Entfernung

des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf die zuvor mit 4 ml MACS-Puffer äquilibrierte, in einem MACS-Ständer eingespannte MACS-Säule (Größe LS) gegeben. Die Säule wurde dreimal mit je 4 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchlauf als Negativfraktion aufgefangen. Um die positiven Zellen von der Säule zu eluieren, wurde die Säule zuerst aus dem MACS-Ständer entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden zweimal je 4 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, wobei die zweiten 4 ml mit einem zu den Säulen passenden Pistill durchgedrückt wurden. Sowohl die Positiv- als auch die Negativfraktion wurden anschließend zentrifugiert, die Zellen einmal mit Waschmedium gewaschen und anschließend in einem der Zellzahl angemessenen Volumen RPMI 1640-Komplettmedium kultiviert.

MACS-Puffer: 0,5 % BSA; 2 mM EDTA in PBS; 4°C

4.1.10 Durchflusszytometrie

Um den Anteil transfizierter Zellen und die Stabilität oder Expression eines Proteins zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) durchgeführt. Die transfizierten Plasmide enthielten entweder Sequenzen für das grünfluoreszierende Protein (GFP) oder ein GFP-Fusionsprotein, wodurch die Grünfluoreszenz der Zellen mittels FACS direkt bestimmt werden konnte. Ca. 1×10^5 Zellen wurden für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Im Falle der Bestimmung der GFP-Expression wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Im Falle einer Oberflächenfärbung der MHC-Klasse-I- bzw. Klasse-II-Moleküle wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, mit 2 µl FITC-markiertem anti-MHC-Klasse-II-Antikörper bzw. PE-markiertem, anti-MHC-Klasse-I-Antikörper versetzt und für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen erneut in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. In manchen Fällen wurde direkt vor der Messung Propidiumjodid (PI) (Endkonzentration 1 µg/ml) zugefügt. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA von Zellen interkaliert. Da die Zellmembran lebender Zellen für diesen Farbstoff nicht durchlässig ist, kann über die PI-Färbung der Anteil an toten Zellen mittels FACS bestimmt werden. Die Messung der Proben erfolgte entweder am FACS Calibur oder am LSR Fortessa. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der CellQuestPro- bzw. FlowJo-Software.

FACS-Puffer: 2 % FCS in PBS

4.1.11 Analyse der T-Zell-Antigenerkennung

Um die antigenspezifische Zytokinausschüttung der T-Zellen zu analysieren, wurden diese mit antigenpräsentierenden Zellen über Nacht kokultiviert. Die antigenpräsentierenden Zellen wurden vorher mit spezifischem Peptid (2 μ M) für zwei Stunden oder rekombinantem Protein (500 ng/ml) bzw. Virus für 24 Stunden in einer 96-Lochplatte in 200 μ l Volumen beladen und vor Zugabe der T-Zellen dreimal mit Waschmedium gewaschen, um bereits vorhandene Zytokine und überschüssiges Antigen in Form von Peptid oder Protein zu entfernen. Die stabilen Transfektanten wurden für verschiedene Zeiten mit Doxzyklin oder Doxzyklin und Erythromycin versetzt. Anschließend wurden die zu analysierenden T-Zellen im Verhältnis 1:1 (je 1×10^5 Zellen pro 200 μ l und Loch) zugesetzt und die Zytokinsekretion nach 16-24 Stunden im Überstand mittels ELISA gemessen.

4.1.12 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für die Bestimmung der Antigenerkennung durch T-Zellen wurden IFN γ - und/oder GM-CSF-ELISA mit Kits der Firma R&D System durchgeführt. Dazu wurden je 100 μ l des entsprechenden *Capture*-AK (1:180 in PBS) in ein Loch einer 96-Loch-Platte gegeben und üN bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit je 300 μ l/Loch Blockpuffer für mindestens eine Stunde bei RT geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte eine zweistündige Inkubation mit je 100 μ l Kulturüberstand bzw. 100 μ l einer Standardlösung in *Reagent diluent*. Anschließend wurden die Platten erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und je 100 μ l/Loch *Detection*-AK (1:180 in *Reagent diluent*) zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 μ l/Loch Streptavidin-HRP (1:200 in *Reagent diluent*) hinzugegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 100 μ l/Loch Färbelösung versetzt und die Färbereaktion nach 5-20 min, je nach Blaufärbung, mit je 50 μ l Stopplösung abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend bei 450 nm mit einem Referenzwert von 620 nm im ELISA-Lesegerät gemessen.

ELISA-Blockpuffer: PBS; 1 % BSA; 5 % Sucrose; 0,05 % NaN₃

ELISA-Waschpuffer: PBS; 0,05 % Tween-20

Reagent diluent: PBS; 1 % BSA; sterilfiltriert

Färbelösung: BD OptEIA Substrat Reagenz A und B (1:1 gemischt)

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

4.1.13 Fluoreszenzmikroskopie

HEK293T Zellen wurden in 10 cm-Kulturschalen auf Polylysin-beschichteten Objektträgern ausgebracht und am nächsten Tag mittels der PEI-Methode mit den verschiedenen Neo-GFP-Expressionsplasmiden transfiziert. 24-48 h später wurden die Objektträger einmal in 1 x PBS gewaschen und anschließend in der Fixierlösung für 20 min bei RT fixiert. Die Fixierung wurde anschließend mit 20 % FCS (in 1 x PBS) für 5 min bei RT gestoppt, wonach die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen wurden. Die Einbettung der Zellen erfolgte in DAPI-haltigem Einbettmedium. Die Deckgläschen wurden anschließend mit Nagellack fixiert. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bis zur Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln bei 4°C.

Fixierlösung: 3 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS

4.2 Mikrobiologische Methoden

Für die Anzucht des *E. coli*-Stamms XL1-*blue* MRF' wurde LB-Medium verwendet, wobei die Anzucht der Bakterien aerob bei 37°C erfolgte. Mit Plasmiden transformierte Bakterien wurden in Gegenwart von Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (25 µg/ml) in Fest- oder Flüssigmedium kultiviert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Bio-Photometer (Eppendorf) bestimmt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien für die Transformation von Plasmid-DNA

In einem 2 l Erlenmeyerkolben wurden 500 ml SOB Medium (+10 µg/ml Tetrazyklin) mit einer Einzelkolonie des Bakterienstamms XL-1 *blue* MRF' angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5–0,7 wurden die Bakterien zuerst für 15 min auf Eis abgekühlt, danach 15 min bei 4.800 x g und 4°C sedimentiert und in 250 ml eiskaltem 10% Glycerin (in H₂O) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und in 250 ml 10 % Glycerin gewaschen. Die Bakterien wurden anschließend in 2-4 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, je 50 µl in 1,5

ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der *XL-1 blue MRF'* erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

4.3.2 Transformation von Bakterien

Nach Auftauen der elektrokompetenten *XL-1 blue MRF'* auf Eis wurden 20 µl der Bakteriensuspension entnommen, mit 1 µl des Ligationsansatzes bzw. der Plasmid-DNA vermischt und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) transformiert (1500 V, 25 µF und 100 Ω). Die Bakterien wurden umgehend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für ½ h bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Im Falle der Transformation von Ligationsansätzen wurden die Bakterien bei 4.600 x g sedimentiert, in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und vollständig auf antibiotikahaltige LB-Platten ausgebracht. Erfolgte die Transformation von Plasmiden, wurde auf den Zentrifugationsschritt verzichtet und 10 – 50 µl der Suspension, je nach Größe des Plasmids, auf den Platten ausgestrichen. Die Bakterienplatten wurden anschließend üN bei 37°C inkubiert.

SOB-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ad 1 l dH₂O

SOC-Medium: SOB-Medium; 0,2 % Glucose; sterilfiltriert

LB-Medium: 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt ad 1 l dH₂O; pH 7,0

LB-Agar: 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Agar ad 1 l dH₂O; pH7,0

4.3.3 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) erfolgte aus einer Übernachtskultur. 1 ml der Bakteriensuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 4.600 x g zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 100 µl E1-Resuspensionspuffer aufgenommen und mit 100 µl E2-Lysepuffer vermischt. Nach einer 2-minütigen Lyse bei RT erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 100 µl E3-Neutralisationspuffer. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 18.000 x g und 4°C sedimentiert. Der Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 800 µl reinem Ethanol versetzt. Die anschließende Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 18.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde anschließend

verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und in 100 µl H₂O gelöst. Zur Überprüfung wurden anschließend 17 µl der unverdünnten gelösten Plasmid-DNA mit 2 µl des entsprechenden Restriktionspuffers versetzt und durch Zugabe von 1 µl des entsprechenden Restriktionsenzym unter Beachtung der geeigneten Temperatur für die maximale Aktivität verdaut.

Resuspensionspuffer E1: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA

Lysepuffer E2: 200 mM NaOH; 1 % SDS

Neutralisierungspuffer E3: 3,1 M Kaliumacetat (pH 5,5)

4.3.4 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) erfolgte mittels „JetStar 2.0-Kit“ der Firma Genomed. 400 ml Superbroth-Medium wurden mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin versetzt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach Inkubation üN bei 37°C im Schüttelinkubator wurden 900 µl der Bakterien suspension zusammen mit 900 µl Einfriermedium in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Der Rest der Kultur wurde für 10 min bei 4.600 x g zentrifugiert. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 10 ml E1-Resuspensionspuffer wurde die Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Lyse durch Zugabe von 10 ml E2-Lysepuffer und 5-minütiger Inkubation bei RT. Hierbei erfolgte die Auflösung der Zellmembran durch SDS und die Denaturierung von Proteinen, Plasmid-DNA und chromosomaler DNA. Durch Zugabe von 10 ml E3-Neutralisierungspuffer wurde die Reaktion gestoppt. Der Ansatz wurde anschließend 20 min bei 7.000 x g und 4°C zentrifugiert. In dieser Zeit wurde eine Maxi-Säule mit 20 ml E4-Äquilibrierungspuffer befüllt. Der Überstand des Bakterienlysats wurde nach der Zentrifugation durch Zellstoff filtriert und auf die Säule gegeben. Die DNA wurde dreimal mit je 20 ml E5-Waschpuffer gewaschen. Die anschließende Elution der DNA von der Säule erfolgte durch die Zugabe von 15 ml E6-Elutionspuffer. Die DNA wurde anschließend in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 10,5 ml Isopropanol vermischt und durch Zentrifugation für 20 min bei 7.000 x g und 4°C gefällt. Das DNA-Pellet wurde daraufhin getrocknet und in 1 ml TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde durch die Ermittlung der DNA-Konzentration am Bio-Photometer (Eppendorf; Wellenlänge 260 nm) bestimmt. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA wurde diese in fünf verschiedenen Ansätzen mit jeweils unterschiedlichen

Restriktionsenzymen verdaut, die DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und deren Größe anschließend unter dem UV-Licht kontrolliert.

Superbroth-Medium: 35 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 5 ml NaOH (1N)

Einfriermedium: LB-Medium; 36 % Glycerin

Puffer E4: 100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 600 mM NaCl; 0,15 % Triton-X-100 in H₂O

Puffer E5: 100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 800 mM NaCl in H₂O

Puffer E6: 100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 1500 mM NaCl in H₂O

TE Puffer: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA in H₂O

4.3.5 DNA-Klonierung

4.3.5.1 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsverdau wurde unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlen Bedingungen durchgeführt. Der Verdau erfolgte bei entsprechender Temperatur für 1-2 h. Dabei wurden sowohl Einzel- als auch Doppelspaltungen für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. Bei Doppelspaltungen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, wurde die DNA nach dem ersten Verdau durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol (Endkonzentration 70%) gefällt und anschließend der zweite Verdau durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Der Erfolg der Spaltung wurde auf einem Agarosegel überprüft.

Tabelle 4.2: Ansatz für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

	Analytische Spaltung	Präparative Spaltung
DNA	1 µg	20 µg
10x Puffer	2 µl	10 µl
Enzym	1 µl (5-50 U/µl)	4 µl (5-50 U/µl)
H₂O	ad 20 µl	ad 100 µl
Alkalische Phosphatase	--	ggf. 1 µl (10 U/µl) für letzten 30 min

4.3.5.2 Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau

Häufig war es für die Klonierung von DNA-Molekülen notwendig, nach dem Restriktionsverdau partiell einzelsträngige DNA-Enden in glatte Enden für die Ligation umzuwandeln. Hierzu wurde die T4-DNA-Polymerase verwendet, die sowohl eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität sowie eine 5'-3'-Polymeraseaktivität besitzt. Nach dem Verdau der Plasmid-DNA wurde der Ansatz auf RT gebracht und wie in Tabelle 4.3 aufgeführt mit T4-DNA Polymerase und dNTPs versetzt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde, um die Reaktion abzustoppen, eine Phenol/Chloroform-Behandlung durchgeführt, oder der Ansatz nach Versetzen mit DNA-Ladepuffer auf ein Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 4.3: Ansatz für die Synthese von glatten Enden mittels T4-DNA-Polymerase

Restriktionsverdau	100 µl
dNTP (je 10 mmol)	1 µl
T4-DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl

4.3.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR ist eine Methode zur gezielten Amplifikation einer ausgewählten Nukleinsäuresequenz, die durch zwei ca. 20 bp lange Oligonukleotide (*Primer*) eingegrenzt wird. Temperaturstabile DNA-Polymerasen erlauben wiederholte DNA-Synthese- und Denaturierungszyklen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Die beiden *Primer* sollten eine ähnliche Schmelztemperatur (knapp über 50°C) besitzen. Eine zu niedrige Schmelztemperatur kann zu einer unspezifischen Bindung der *Primer* und somit auch zu unspezifischen PCR-Produkten führen. Zur Berechnung der Schmelztemperatur T_M gilt folgende Regel:

$$T_M = 4 \times \Sigma(GC) + 2 \times \Sigma(AT)$$

Die Anlagerungs-Temperatur sollte ca. 5°C unter der Schmelztemperatur liegen. Die *Primer* sollten nicht mit sich selbst hybridisieren und nur an eine DNA-Sequenz binden können. In Tabelle 4.4 ist der Ansatz für eine Standard-PCR aufgeführt.

Tabelle 4.4: Standard PCR-Ansatz

cDNA bzw. Plasmid-DNA (1:100)	2 µl
5 x <i>Phusion</i> Reaktionspuffer	20 µl
DMSO	5 µl
dNTP (je 100 mmol)	2 µl
<i>Primer sense</i> (100 pmol/µl)	2 µl
<i>Primer antisense</i> (100 pmol/µl)	2 µl
H ₂ O	66 µl
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase (2 U/µl)	1 µl

Der PCR-Ansatz (ohne *Phusion* DNA-Polymerase) wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und zu Beginn auf 98°C in der PCR-Maschine erhitzt. Die Temperatur wurde anschließend auf 98°C gehalten und die *Phusion* DNA-Polymerase zu dem Ansatz hinzugegeben. Danach wurde das vorgegebene PCR-Programm fortgeführt. Das Programm richtete sich nach der Schmelztemperatur der jeweiligen *Primer* und der Länge der erwarteten PCR-Produkte (ca. 15 sec/kb). In Tabelle 4.5 ist ein Standard-PCR-Programm aufgeführt.

Tabelle 4.5: Standard PCR-Programm mit 30-45 Zyklen

Denaturierung	98°C	15 sec
Anlagerung	63-65°C	15 sec
Synthese	72°C	15 sec pro 1kb

Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit 1/4 Volumen 4x DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1-2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für eine spätere Klonierung und Aufreinigung wurden drei 100 µl PCR-Ansätze aufgetragen.

4.3.5.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion diente dazu, die DNA nach T4-DNA-Polymerase-Behandlung oder Restriktionsverdau von den Enzymen zu trennen und aufzureinigen. Hierzu wurde die DNA mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 150 µl Phenol versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken wurde der Ansatz mit 150 µl Chloroform gemischt und 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, wobei die obere wässrige Phase die DNA enthielt. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde mit dem 2,5-fachen Volumen an reinem Ethanol versetzt

und die DNA 20 min bei 18.000 x g und 4°C gefällt. Das DNA-*Pellet* wurde getrocknet und abschließend in entsprechendem Volumen an H₂O gelöst.

4.3.5.5 Agarosegelelektrophorese

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde Agarose mit einer Endkonzentration zwischen 1% und 2% (w/v) in 1 x TAE-Puffer gegeben, erhitzt, anschließend auf 50°C abgekühlt, mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelapparatur gegossen. Nach Erkaltung des Gels wurden die mit DNA-Ladepuffer versetzten DNA-Proben auf das Gel aufgetragen und die Fragmente bei 120 V für 1,5 h oder bei 20 V üN aufgetrennt. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente ein 1 kb DNA-Größenstandard. Die Detektion und Dokumentation der aufgetrennten DNA erfolgte mittels eines UV-Transilluminators bei 253 nm.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 7,8; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA

4.3.5.6 Isolierung und Aufbereitung von DNA-Fragmenten

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurden die Banden der entsprechenden Größe nach präparativem Verdau und Agarosegelelektrophorese unter dem UV-Transilluminator bei längerwelligem UV-Licht von 365 nm, um UV-bedingte Schäden der DNA zu vermindern, ausgeschnitten und anschließend mittels des peqGOLD Gel-Extraktions-Kit von Peqlab aufgereinigt. Hierzu wurde das gewünschte Gelstück mit einem Skalpell ausgeschnitten, 1:1 (w/w) mit Bindepuffer XP2 versetzt, auf 55 – 60°C im Wasserbad erwärmt und gelöst. Anschließend wurde die gelöste DNA über eine Säule aufgereinigt, indem 750 µl, wenn nötig mehrfach, auf die Säule aufgetragen, bei 18.000 x g für 1 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen wurde. Die Säule wurde danach mit 600 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers SPW zweimal gewaschen, die Säule bei 18.000 x g für 2 min trocken zentrifugiert und die DNA anschließend mit 30 µl H₂O in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Der Erfolg der Aufreinigung und die Mengenverhältnisse der gelösten DNA-Proben wurden anschließend mittels Auftrennung eines Aliquots durch Agarosegelelektrophorese und Betrachtung unter dem UV-Transilluminator bei 253 nm abgeschätzt und dementsprechend die Ligationen angesetzt.

4.3.5.7 Ligation zweier DNA-Moleküle

Bei der Ligation werden überhängende kompatible, oder glatte Enden zweier linearer DNA-Moleküle kovalent miteinander verbunden. Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert hierbei ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'Hydroxylgruppe des einen und der 5'Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragments.

Vektor und *Insert* wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte im Wasserbad bei 16°C für mindestens 2 h oder üN. Anschließend wurden Bakterien mit 1 µl der Ligation transformiert.

Tabelle 4.6: Ansatz der Ligation

Vektor-DNA	2 µl
Insert-DNA	6 µl
10xT4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl
T4 DNA-Ligase (40 U/µl)	1 µl

4.3.5.8 Klonierung von shRNA

Die beiden entsprechenden Oligonukleotide, welche mit Hilfe des RNAi-Designer Programms von Invitrogen konzipiert worden waren, wurden im Verhältnis 1:1 in einem 20 µl-Ansatz gemischt und für 1 min auf 95°C im Heizblock erhitzt. Danach wurde der Ansatz langsam für 2 h auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei sich die beiden Oligonukleotide anlagern sollten. Das kurze, doppelsträngige Fragment wurde anschließend, wie in Abschnitt 4.3.5.7 beschrieben, in den pMIRTOP-Vektor (verdaut mit Bpil) ligiert. Ausgehend von diesem Plasmid wurde die shRNA in weitere Folgeplasmide kloniert.

4.3.5.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip des *cycle sequencing*, welches auf dem nach Sanger et al. (Sanger and Coulson, 1975) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Di-Desoxynukleotiden basiert, durchgeführt. Die Sequenzanalyse und -auswertung erfolgte durch den Sequenzierservice Sequiserve (Vaterstetten) oder GATC Biotech (Konstanz).

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Herstellung von RIPA-Extrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden 1×10^6 Zellen 5 min bei 400 x g zentrifugiert und anschließend zweimal in 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 µl eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder sofort 1:3 (V/V) mit 3 x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min aufgekocht.

RIPA-Puffer: 1% NP40; 0,5% DOC (Deoxycholat); 0,15 M NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris pH 8,0; 0,1% SDS in H₂O (+1 mg/ml Proteaseinhibitorcocktail von Roche frisch dazu gegeben)

SDS-Ladepuffer: 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM DTT; 0,2 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 0,4 % Bromphenolblau in H₂O

4.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration der Polyacrylamidgele betrug im Sammelgel 4 % und im Trenngel, je nach Größe der zu detektierenden Proteine 8%, 10,5%, oder 14%. Als Proteinstandard wurde der „*Page Ruler Prestained Protein Ladder*“ (Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Gelkammer in 1 x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für 2-3 h oder bei 20-30 V üN. Durch die Western-Blot-Analyse oder eine Coomassie-Färbung konnten Proteine anschließend detektiert werden.

2 x Tris/SDS pH 6,8: 7,56 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS pH 6,8; H₂O ad 250 ml

2 x Tris/SDS pH 8,8: 22,68 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS; pH 8,8; H₂O ad 250 ml

1 x SDS-Elektrophoresepuffer: 0,025 M Tris-Base; 0,2 M Glycin; 0,1 % SDS in H₂O

Sammelgel: 2 ml 30 % PAA; 7,5 ml 2 x Tris/SDS pH 6,8; 5,4 ml H₂O; 90 µl 10 % APS; 10 µl TEMED

Trenngel (8%): 5,3 ml 30 % PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8; 4,5 ml H₂O; 167 µl 10 % APS; 17 µl TEMED

Trenngel (10,5%): 7 ml 30 % PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8; 2,8 ml H₂O; 167 µl 10 % APS; 17 µl TEMED

Trenngel (14%): 9,3 ml 30 % PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8; 0,5 ml H₂O; 167 µl 10 % APS; 17 µl TEMED

4.4.3 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brillant-Blau bindet an basische Seitenketten von Aminosäuren und färbt somit Proteine unspezifisch an. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel für 15 min in H₂O gewaschen. Anschließend wurde es in Coomassie-Färbelösung (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) üN unter Schwenken inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel durch Waschen in H₂O entfärbt, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Anschließend wurde das Gel für 15 min in Entfärbelösung unter Schwenken inkubiert. Um das Gel zu trocknen, wurde es anschließend zwischen zwei zuvor mit Entfärbelösung angefeuchteten Folien (Gel Drying Film, Promega) eingebettet und in einen Rahmen üN zum Trocknen eingespannt.

Entfärbelösung: 40 % MeOH; 10 % Glycerin; 7,5 % Essigsäure in H₂O

4.4.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

4.4.4.1 Protein-Transfer (Western-Blot)

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen. Mittels einer Nassblotanlage erfolgte der Transfer von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, GE Healthcare) in Transferpuffer. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 300 mA für 1-2 h bei 4°C.

Transfer-Puffer: 21 g Glycin; 4,5 g Tris; 300 ml Methanol; ad 1,5 l H₂O

4.4.4.2 Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach dem Transfer von Proteinen wurde die PVDF-Membran zur Absättigung von freien Bindestellen für 1 h bei RT oder üN bei 4°C in Block-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit Wasch-Puffer gewaschen und bei RT für 2 h oder üN bei 4°C mit der Primärantikörper-Lösung unter Schwenken inkubiert. Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer unter Schwenken gewaschen, worauf die Membran für 1 h mit der Sekundär-Antikörperlösung inkubiert wurde. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Proteine mit Hilfe des ECL-Plus-Detektionssystems (GE Healthcare) nach Anleitung des Herstellers und nachfolgender Belichtung eines Röntgenfilms (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive, Agfa HealthCare) nachgewiesen. Alternativ zu dem erwähnten ECL-Kit wurden selbst hergestellte ECL-Lösungen für die Detektion verwendet. Hierzu wurden pro Membran 4 ml Lösung A mit 1,2 µl 98% Wasserstoffperoxidlösung und 400 µl Lösung B vermischt und auf die Membran gegeben. Nach 3-minütiger Entwicklungszeit konnten die Signale ebenfalls durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

Block-Puffer: 5 % Magermilchpulver in PBS

Wasch-Puffer: 1 % Magermilchpulver in PBS

Lösung A: 40 ml 0,1 M TRIS-HCl (pH 8,6); 10 mg Luminol

Lösung B: 20 ml DMSO; 22 mg para-Hydroxycoumarinsäure

Die Primärantikörper wurden in den folgenden Verdünnungen in Waschpuffer eingesetzt:

Tabelle 4.7: Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Primärantikörper

Spezifität	Spezies	Verdünnung
Atg5	Kaninchen	1:1000
Beclin1	Maus	1:1000
LC3	Kaninchen	1:500
p62	Maus	1:50
Raptor	Maus	1:200
Rictor	Maus	1:200
GFP	Maus	1:500
EBNA3C	Maus	1:10
Myc	Maus	1:20
His6	Maus	1:50

Spezifität	Spezies	Verdünnung
BRLF1	Maus	1:500
Aktin	Maus	1:500
GAPDH	Maus	1:5000
Tubulin	Ratte	1:5000

Die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG, anti-Ratte-IgG und -IgM und anti-Kaninchen-IgG wurden 1:10.000 verdünnt eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines Testsystems zur zeitlich getrennten Expression eines Modellantigens und der Modulation von Autophagie

In früheren Arbeiten, auch der eigenen Arbeitsgruppe, wurde hauptsächlich durch den Einsatz von Inhibitoren wie z.B. 3-Methyladenin (3-MA) gezeigt, dass Makroautophagie (im Folgenden als Autophagie bezeichnet) zur Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-II beiträgt (Nimmerjahn et al., 2003, Riedel et al., 2008). Da unspezifische oder toxische Effekte dieser Inhibitoren bislang nicht ausgeschlossen werden konnten, sollten in der vorliegenden Arbeit durch die Expression oder den *knock-down* von Autophagie-regulierenden Genen weitere Hinweise für die Beteiligung der Autophagie an der Antigenpräsentation geliefert und dieser Präsentationsweg näher charakterisiert werden.

Da in Voruntersuchungen keine Reduktion der MHC-II-Präsentation eines Modellantigens beobachtet wurde, wenn ein *knock-down* Autophagie-assoziiierter Gene gleichzeitig mit der Modellantigen-Expression erfolgte (Birnkammer, 2008), sollte die Modulation von Autophagie zeitlich vor der Modellantigen-Expression erfolgen. Dazu wurde, ausgehend vom Plasmid pRTS-1 (Bornkamm et al., 2005) ein Vektor generiert, der zwei konditional regulierbare Promotoren trägt: einen Erythromycin-regulierbaren Promotor (P Ery) sowie einen bidirektionalen Tetrazyklin-induzierbaren Promotor P-bi Tet, welcher die gleichzeitige Expression eines Reportergens, beispielsweise des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und eines weiteren Gens oder einer shRNA erlaubt. Der P-bi Tet-Promotor basiert auf dem sogenannten Tet-On-System, welches die Transkription von Genen in Anwesenheit von Tetrazyklin bzw. dem Tetrazyklin-Derivat Doxyzyklin erlaubt (Gossen et al., 1995). Der Transaktivator rtTA (*reverse tetracycline-controlled transactivator protein*), der auf dem Plasmid unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors kodiert ist, kann die Transkription des Zielgens nur ermöglichen, wenn er Tetrazyklin gebunden hat. Durch die zusätzliche Expression des Tet-Repressors tTS (*transsilencer*), welcher durch Bindung an die Operator-Sequenzen die Transkription des Gens verhindert und erst in Anwesenheit von Tetrazyklin von der DNA dissoziiert, wird eine um ein vielfaches erhöhte Regulierbarkeit durch Tetrazyklin erreicht. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde zudem aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Fussenegger (Weber et al., 2002) ein

Promotor entwickelt, der es ermöglicht, Zielgene nur unter gleichzeitiger Anwesenheit von Tetrazyklin/Doxyzyklin und Erythromycin zu exprimieren. Der Transaktivator rtTA kann auch hier nur in Anwesenheit von Tetrazyklin binden, allerdings wird die Transkription zusätzlich durch einen Erythromycin-regulierbaren Repressor verhindert, welcher ebenfalls auf dem Plasmid kodiert und konstitutiv exprimiert wird. Dieser Repressor dissoziiert erst von der DNA, wenn er Erythromycin gebunden hat. Er basiert auf der transkriptionsinhibierenden Eigenschaft von KRAB-Domänen (*krüppel associated box domain*), welche in Zink-Finger-Protein-basierenden Transkriptionsfaktoren von Säugetierzellen vorkommen (Tian et al., 2006, Urrutia, 2003). Eine schematische Übersicht des Tet-Ery-Systems ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Die generierten Plasmide enthalten außerdem den Replikationsursprung von EBV (oriP) und das EBNA1-Gen (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 1*), wodurch eine episomale Replikation des Plasmids nach Transfektion in humanen Zellen gewährleistet wird und die Expression von Genen nach stabiler Transfektion keinen Positionseffekten unterliegt. Zusätzlich ist eine Puromycin-Resistenzkassette enthalten, die durch Zugabe von Puromycin in das Kulturmedium eine Selektion transfizierter Zellen ermöglicht.

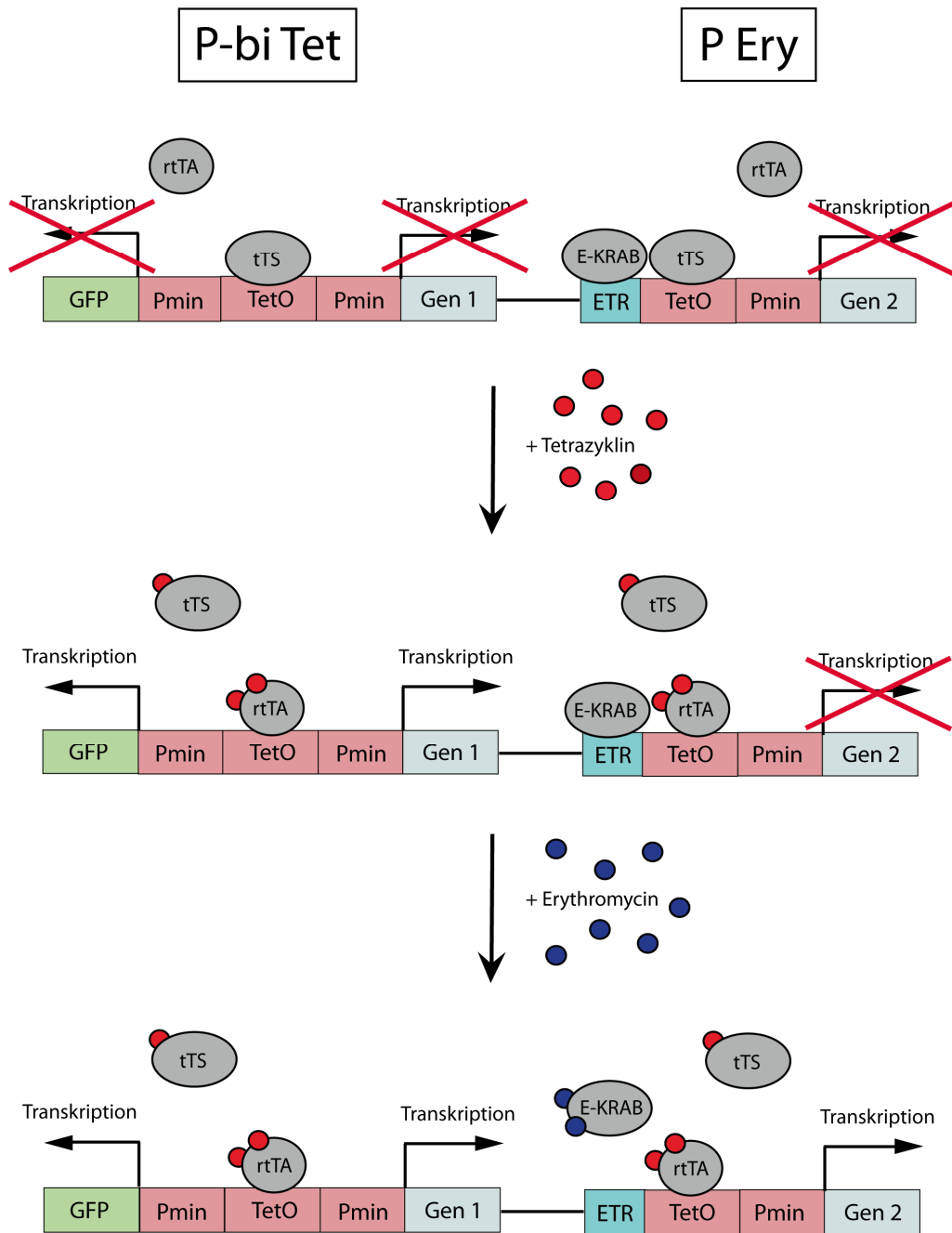


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Tet-On und E-KRAB-Systems

Das Gen 1 und GFP liegen unter der Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors (Pmin), welchem Tet-Operator-Sequenzen (TetO aus *E. coli*) vorgeschaltet sind. Der *transsilencer* tTS bindet in Abwesenheit von Tetracyklin an die Operator-Sequenz und verhindert die Transkription von GFP und von Gen 1. Der *reverse tetracycline-controlled transactivator* (rtTA) bindet nur in Anwesenheit von Tetracyklin an die Operator-Sequenzen und erlaubt somit die Transkription des Reportergens GFP und von Gen 1. Das Ergebnis dieses Zusammenspiels ist ein großer Regulationsbereich durch Tetracyklin. Gen 2 wird in diesem Zustand nicht transkribiert, da der Repressor E-KRAB an Repressor-Bindesequenzen (ETR) bindet und somit die Transkription inhibiert. Erst durch Zugabe von Erythromycin dissoziiert der Repressor von der DNA und die Transkription von Gen 2 erfolgt unter gleichzeitiger Anwesenheit von Tetracyklin bzw. dem Tetracyklin-Derivat Doxyzyklin.

5.1.1 Autophagie-abhängige Präsentation des Modellantigens NucNeoR auf MHC-Klasse-II nach konditionaler Expression in LCL

In früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe erwies sich die nukleäre Form der Neomycin-Phosphotransferase II (NucNeoR) als geeignetes Modellantigen zur Untersuchung der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II (Riedel et al., 2008). Um die Funktionalität des konditionalen Vektorsystems mit einem bekannten Modellantigen zu überprüfen, wurde NucNeoR unter die Kontrolle des Erythromycin-induzierbaren Promotors kloniert und die Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängige Proteinexpression von NucNeoR in der lymphoblastoiden Zelllinie (LCL) EBV1.11 getestet. Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Doxyzyklin und Erythromycin im Kulturmedium wurde NucNeoR exprimiert, nicht jedoch in deren Abwesenheit oder nach alleiniger Zugabe eines der beiden Antibiotika (Abbildung 5.2 c). Durch Kokultivierung mit dem NeoR-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klon 20-4/A4 und anschließender Messung der GM-CSF-Freisetzung durch diesen im ELISA, wurde zudem die Antigenpräsentation von NucNeoR im Kontext von HLA-DP3 analysiert. Auch die Präsentation von NucNeoR erfolgte konzentrationsabhängig in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin (Abbildung 5.2 d).

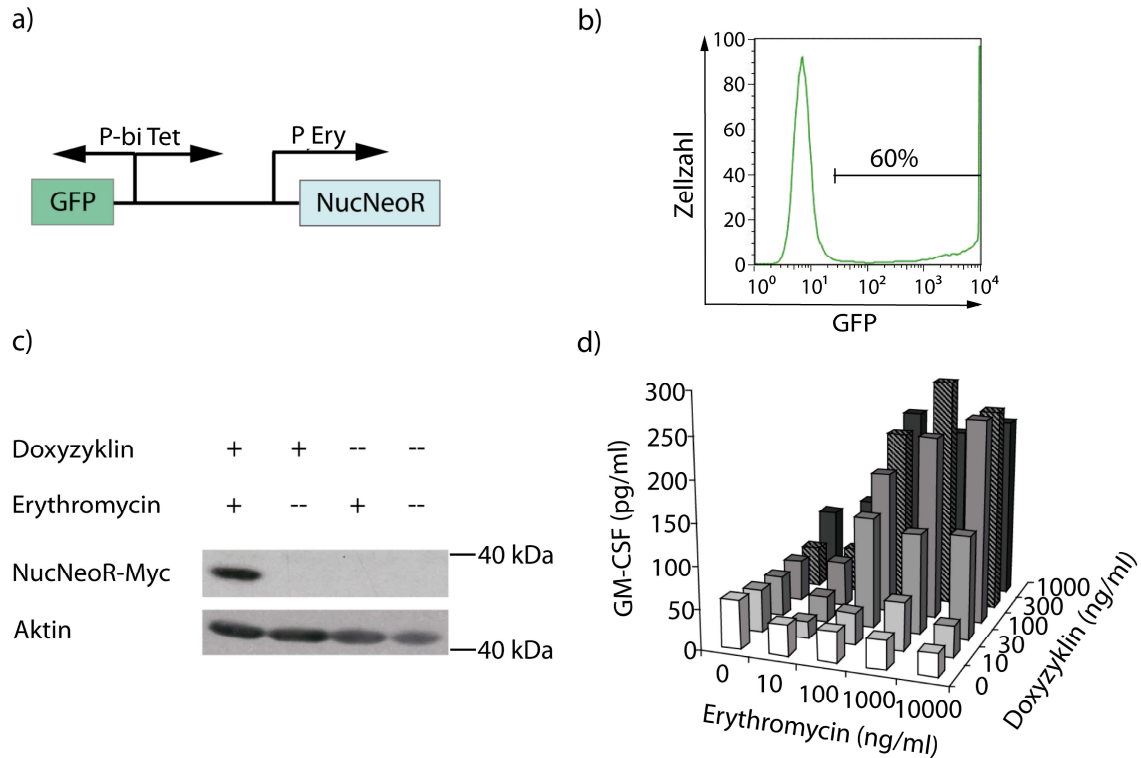


Abbildung 5.2: NucNeoR wird Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängig exprimiert und auf MHC-II präsentiert

a) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids, das stabil in die lymphoblastoide Zelllinie EBV1.11 eingebracht wurde: die Transkription von NucNeoR erfolgt durch einen Erythromycin-regulierbaren Promotor, die des Reportergens GFP durch einen Tetrazyklin-induzierbaren Promotor. **b)** Transfizierte und mittels Puromycin selektierte EBV1.11-Tet-Ery-NucNeoR-Zellen wurden für 48 h mit 1000 ng/ml Doxyzyklin inkubiert und anschließend der Anteil transfizierter (GFP+) Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. **c)** EBV1.11-Tet-Ery-NucNeoR-Zellen wurden, wie angegeben, für 48 h mit Doxyzyklin und Erythromycin (je 1000 ng/ml) behandelt und anschließend die NucNeoR-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein Aktin. **d)** EBV1.11-Tet-Ery-NucNeoR-Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin induziert und anschließend mit dem NeoR-spezifischen CD4+ T-Zellklon 20-4/A4 für 20 h kokultiviert. Die GM-CSF-Freisetzung durch die T-Zellen wurde anschließend mittels ELISA bestimmt. Abkürzungen: P Tet-bi: bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; P Ery: Erythromycin-regulierbarer Promotor. Sowohl die in dieser Abbildung gezeigten, wie auch alle nachfolgenden Untersuchungen zur Antigenpräsentation wurden mindestens dreimal durchgeführt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Um die Autophagie-abhängige Präsentation von NucNeoR in diesem Zellsystem zu verifizieren, wurden EBV1.11-Tet-Ery-NucNeoR-Zellen mit 300 ng/ml Doxyzyklin und steigenden Mengen an Erythromycin für 24 h behandelt. Anschließend wurde 3-Methyladenin (3-MA), welches die Bildung von Autophagosomen inhibiert, bzw. Leupeptin, welches Cysteinproteasen in Endosomen und Lysosomen hemmt, für weitere 24 h zugegeben. Nach gründlichem Auswaschen der Inhibitoren wurden die

Zellen mit den NeoR-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Beide Inhibitoren hemmten die Präsentation von NucNeoR auf MHC-II (Abbildung 5.3). Toxische Effekte dieser Inhibitoren wurden bereits in früheren Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe und in eigenen Kontrollexperimenten (Daten nicht gezeigt) ausgeschlossen (Riedel, 2007).

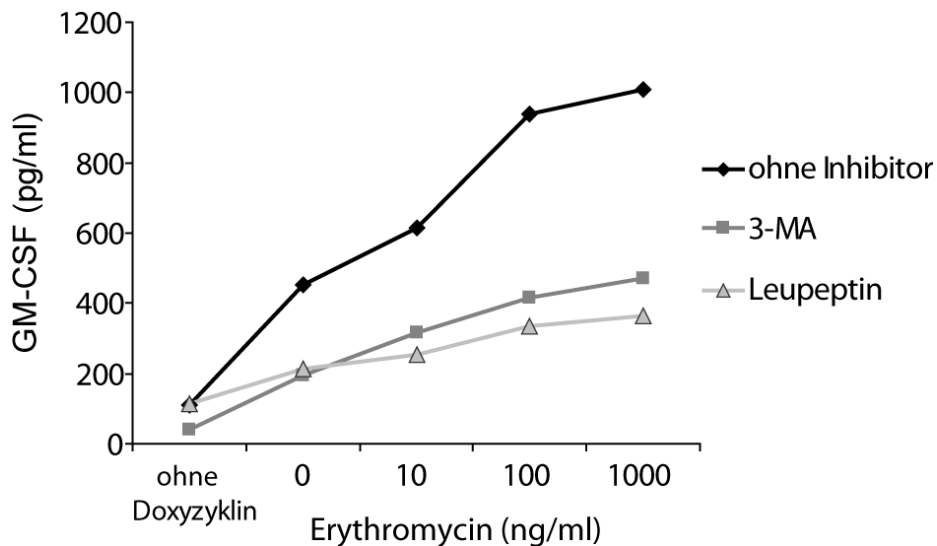


Abbildung 5.3: Die Präsentation von NucNeoR erfolgt Autophagie-abhängig auf MHC-Klasse-II

EBV1.11-Tet-Ery-NucNeoR-Zellen wurden mit 300 ng/ml Doxyzyklin und steigenden Mengen an Erythromycin behandelt. Nach 24 h erfolgte die Zugabe des PI3K-Inhibitors 3-MA (7,5 mM) bzw. des Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (200 µg/ml). Weitere 24 h später wurden die Inhibitoren aus dem Kulturmedium ausgewaschen und die Zellen mit dem NeoR-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon 20-4/A4 für 20 h kokultiviert. Die Messung der GM-CSF-Freisetzung durch die T-Zellen erfolgte anschließend mittels ELISA. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

5.1.2 Etablierung von EBNA3C als Modellantigen für die Untersuchung der endogenen Präsentation auf MHC-Klasse-II

Die angestrebte Untersuchung des Einflusses verschiedener Autophagie-assoziierter Gene auf die Antigenpräsentation setzte die stabile Transfektion von geeigneten Zelllinien mit den konditionalen Expressionsvektoren voraus. Da jedoch die Transfektionseffizienz von LCL generell sehr niedrig ist, wurde auf die deutlich besser transfizierbare Burkitt-Lymphomzelllinie Raji zurückgegriffen. Aufgrund des HLA-Genotyps der Linie war aber eine Untersuchung der Präsentation von NeoR nicht möglich. Deshalb wurde zunächst die Eignung von EBNA3C (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C*) als Modellantigen getestet. EBNA3C wurde gewählt, weil Raji-Zellen mit einem EBV-Stamm infiziert sind, der eine Deletion im EBNA3C-Gen aufweist

und die Zellen deshalb kein endogenes EBNA3C exprimieren. Außerdem stand der CD4⁺ T-Zellklon SLE3C zu Verfügung, der ein Peptid von EBNA3C auf dem von Raji-Zellen exprimierten HLA-DQB1*0501 Allel erkennt. Auch EBNA3C wurde in den stabil transfizierten Raji-Tet-Ery-EBNA3C-Zellen nur nach gleichzeitiger Behandlung mit Doxyzyklin und Erythromycin exprimiert (Abbildung 5.4). Die Erkennung der Zellen durch EBNA3C-spezifische CD4⁺ T-Zellen erfolgte ebenfalls konzentrationsabhängig und nur nach Zugabe beider Antibiotika (Abbildung 5.4 d).

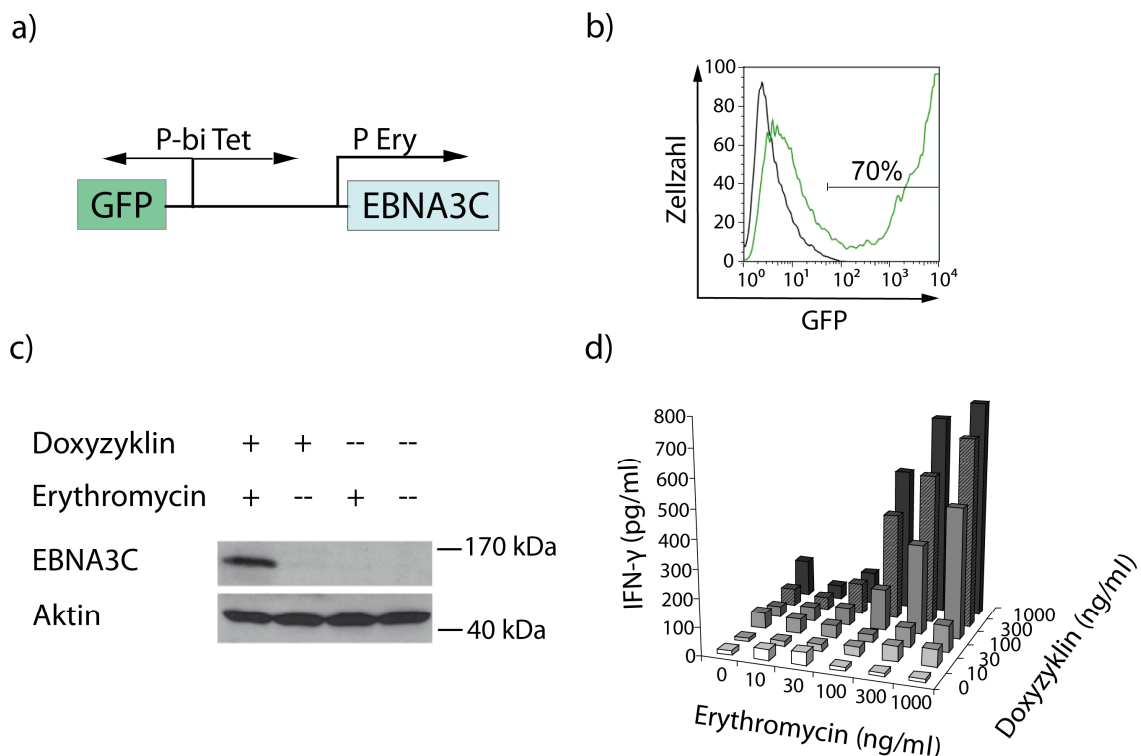


Abbildung 5.4: EBNA3C wird Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängig exprimiert und auf MHC-II präsentiert

a) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids, mit welchem die Burkittlymphom-Zelllinie Raji stabil transfiziert wurde: EBNA3C wird Erythromycin-abhängig, das Reportergen GFP Tetrazyklin-abhängig exprimiert. **b)** Transfizierte und mittels Puromycin selektierte Raji-Tet-Ery-EBNA3C-Zellen wurden für 24 h mit 1000 ng/ml Doxyzyklin behandelt und anschließend der Anteil GFP⁺ Zellen (grüne Kurve) mittels FACS-Analyse bestimmt. Schwarze Kurve: unbehandelte Zellen **c)** Raji-Tet-Ery-EBNA3C-Zellen wurden, wie angegeben, mit Doxyzyklin und Erythromycin (jeweils 1000 ng/ml) für 48 h behandelt und anschließend EBNA3C-Protein mittels Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein Aktin. **d)** Raji-Tet-Ery-EBNA3C-Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und anschließend mit dem EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon SLE3C für 20 h kokultiviert. Die IFN- γ -Freisetzung durch die T-Zellen wurde anschließend mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Präsentation wurde ebenfalls durch 3-MA inhibiert (Abbildung 5.5), was EBNA3C zu einem geeigneten Modellantigen für weitere Untersuchungen machte.

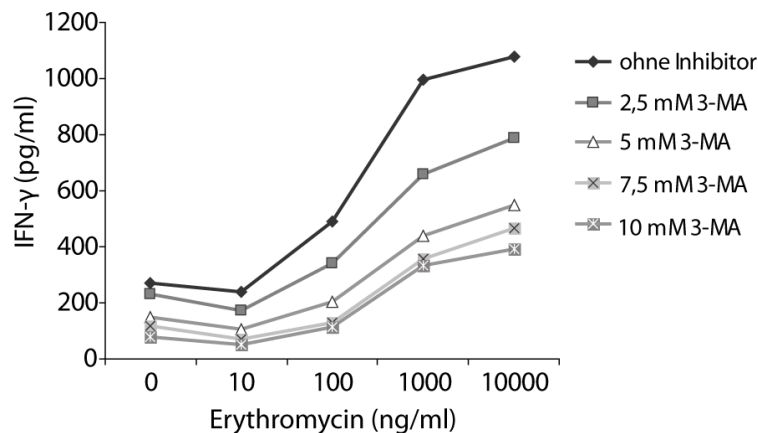


Abbildung 5.5: Die Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II wird durch den PI3K-Inhibitor 3-Methyladenin gehemmt

Raji-Tet-Ery-EBNA3C-Zellen wurden mit 30 ng/ml Doxzyklin und steigenden Mengen an Erythromycin behandelt. 24 h später erfolgte die Zugabe von 3-MA in verschiedenen Konzentrationen. Nach weiteren 24 h wurde der Inhibitor ausgewaschen und die Zellen für 20 h mit dem CD4+ EBNA3C-spezifischen T-Zellklon SLE3C kokultiviert. Die IFN- γ -Ausschüttung durch die T-Zellen wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

5.2 Untersuchung des Einflusses Autophagie-assoziiierter Gene auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-II

5.2.1 Der *knock-down* von Beclin-1 in antigenpräsentierenden Zellen führt nicht zu einer verringerten Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II

Um den Einfluss von Beclin-1 auf die Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II zu untersuchen, wurden in Vorarbeiten Vektoren zur Expression spezifischer shRNAs gegen Beclin-1 generiert (Birnkammer, 2008). Beclin-1 ist im Komplex mit der Klasse III-Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K/VPS34) an der Initiation der Autophagosomenbildung beteiligt (Munz, 2009). Die Funktionalität von zwei gleichzeitig exprimierten shRNAs gegen Beclin-1 wurde durch Koexpression mit einem Expressionsplasmid für Beclin-1 in HEK293T-Zellen getestet. Die Expression der shRNAs gegen Beclin-1, nicht jedoch einer gegen Luciferase gerichteten Kontroll-

shRNA, führte zu einer Reduktion der Beclin-1-Proteinmenge (Abbildung 5.6). Allerdings führten auch hohe shRNA-Mengen nicht zu einem kompletten *knock-down* der Beclin-1-Proteinmengen, was sich durch eine recht lange Halbwertszeit des endogenen Beclin-1 von 61 h erklären lässt (Lian et al., 2011).

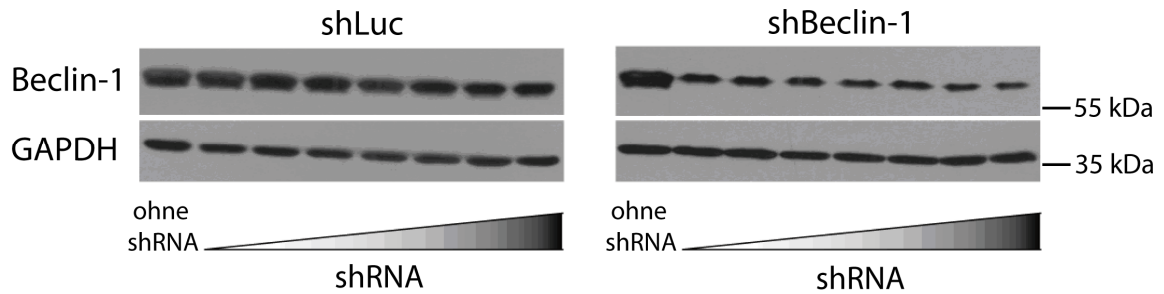


Abbildung 5.6: Die Expression Beclin-1-spezifischer shRNA, nicht jedoch einer gegen Luciferase gerichteten Kontroll-shRNA, führt zu einem *knock-down* von überexprimiertem Beclin-1 in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden jeweils mit einer konstanten Menge an Beclin-1 und steigenden Mengen (1-7 μ g) an shRNA-Expressionsplasmiden transfiziert. Die Beclin-1-Proteinmengen wurden 36 h nach Transfektion mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Daraufhin wurden die Beclin-1-spezifischen shRNAs in das Tet-Ery-EBNA3C-Plasmid unter die Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Promotors kloniert. Die Doxyzyklin-abhängige Regulierbarkeit der Beclin-1-Proteinmenge wurde durch die Behandlung der stabilen Transfektante Raji-Tet-shBeclin1-Ery-EBNA3C mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxyzyklin getestet. Eine Herunterregulation der Beclin-1-Proteinmenge konnte ab einer Konzentration von 300 ng/ml beobachtet werden (Abbildung 5.7).

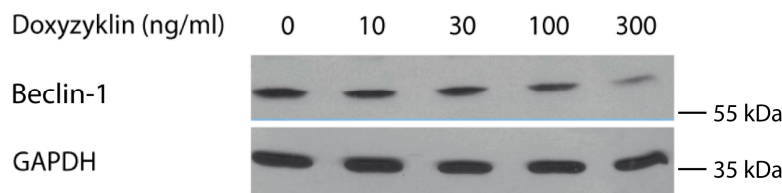
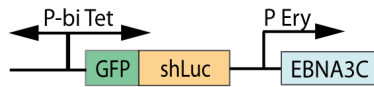


Abbildung 5.7: Doxyzyklin-abhängiger *knock-down* von Beclin-1 in stabil transfizierten Raji-Zellen

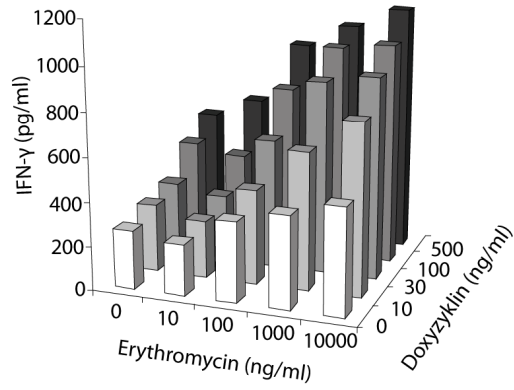
Raji-Tet-shBeclin-1-Ery-EBNA3C-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxyzyklin behandelt und nach 48 h die Beclin-1-Proteinmengen mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Zur Beantwortung der Frage, ob Beclin-1 bei der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II eine Rolle spielt, wurden die stabil transfizierten Zelllinien Raji-Tet-shBeclin-1-Ery-EBNA3C, und als Kontrolle Raji-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C, mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin für 36 h behandelt. Beide Zelllinien wiesen einen vergleichbaren Prozentsatz an transfizierten Zellen und nahezu identische Mengen an EBNA3C-Protein auf. Obwohl die Expression der gegen Beclin-1 gerichteten shRNA, nicht aber der Kontroll shRNA, zu einer Reduktion der Beclin-1-Proteinmenge führte, wurden beide Zelllinien nahezu gleich gut von den EBNA3C-spezifischen SLE3C T-Zellen erkannt (Abbildung 5.8). Um diese, gegen eine Beteiligung von Beclin-1 in der Antigenpräsentation sprechenden Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Zellen parallel jeweils mit 7,5 mM 3-MA behandelt. Würde der *knock-down* von Beclin-1 die Autophagie-abhängige Antigenpräsentation signifikant blockieren, so sollte die Inhibition der im Signalweg vorgeschalteten PI3K durch 3-MA zu keiner weiteren Reduktion der T-Zellerkennung mehr führen. Da aber 3-MA die Präsentation von EBNA3C deutlich inhibierte, war Beclin-1 für die Antigenpräsentation entweder nicht essentiell, oder die noch vorhandenen Mengen an Beclin-1 waren für die Antigenpräsentation ausreichend (Abbildung 5.8).

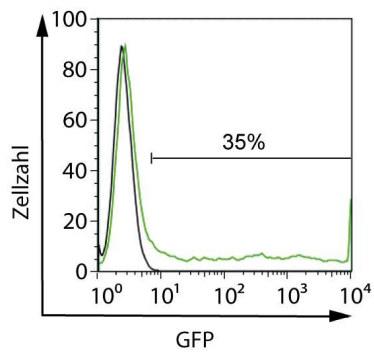
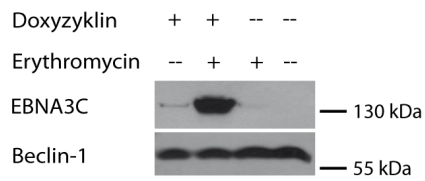
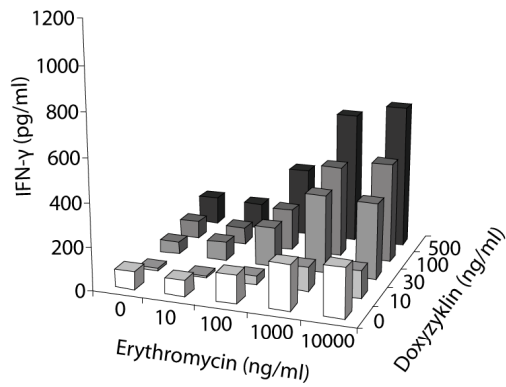
a)



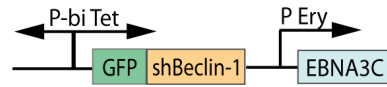
ohne Inhibitor



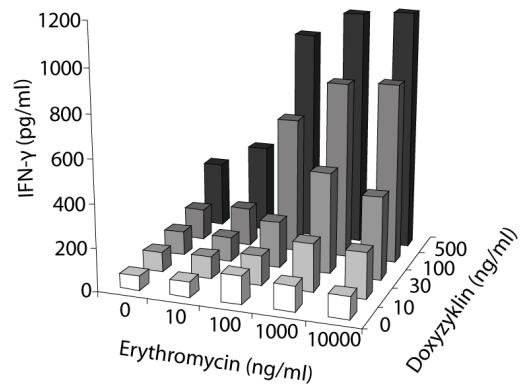
3-MA



b)



ohne Inhibitor



3-MA

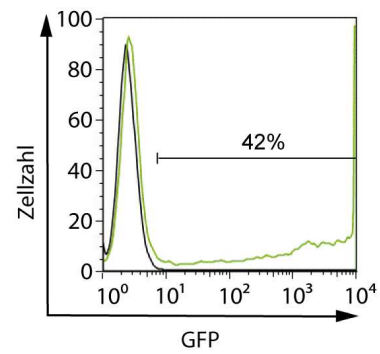
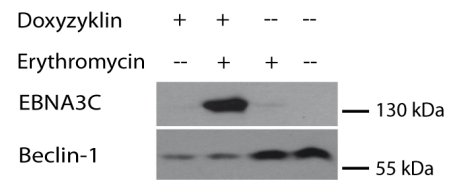
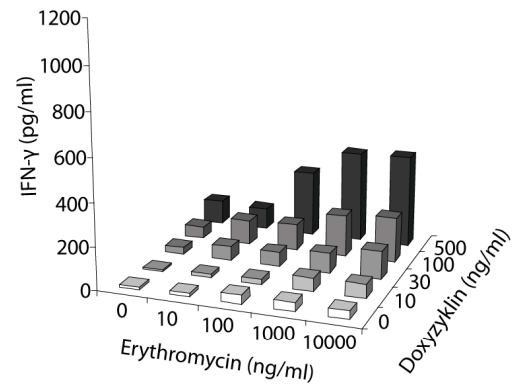


Abbildung 5.8: Der *knock-down* von Beclin-1 beeinträchtigt nicht die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II

Raji-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C-Zellen **(a)** bzw. Raji-Tet-shBeclin-1-Ery-EBNA3C-Zellen **(b)** wurden für 36 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und anschließend mit dem EBNA3C-spezifischen CD4+ T-Zellklon SLE3C für 20 h kokultiviert. Danach wurde die Menge an IFN- γ im Kulturüberstand im ELISA gemessen. Parallel dazu wurden die Zellen mit je 1000 ng/ml Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und die EBNA3C- und Beclin-1-Proteinmengen mittels Western Blot sowie der Anteil transfizierter, GFP+ Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt (grüne Kurve: mit Doxyzyklin behandelte Zellen; schwarze Kurve: unbehandelte Zellen). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Wie bereits in früheren Untersuchungen beobachtet, war der fehlende Einfluss des Beclin-1-*knock-down* auf die EBNA3C-Präsentation möglicherweise auf die gleichzeitige Expression von Antigen und shRNA zurückzuführen. Um eine Verminderung der Beclin-1-Proteinmenge bereits vor der Expression des Antigens zu erreichen, wurden Raji-Tet-shBeclin-1-Ery-EBNA3C-Zellen für 12 bzw. 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin vorbehandelt, gewaschen, und danach die Expression des Antigens durch Zugabe von Doxyzyklin und Erythromycin für 36 h induziert. Auch die Expression von Beclin1-spezifischer shRNA 12 h (Abbildung 5.9 a) oder 24 h (Abbildung 5.9 b) vor Expression des Antigens EBNA3C hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Antigenpräsentation.

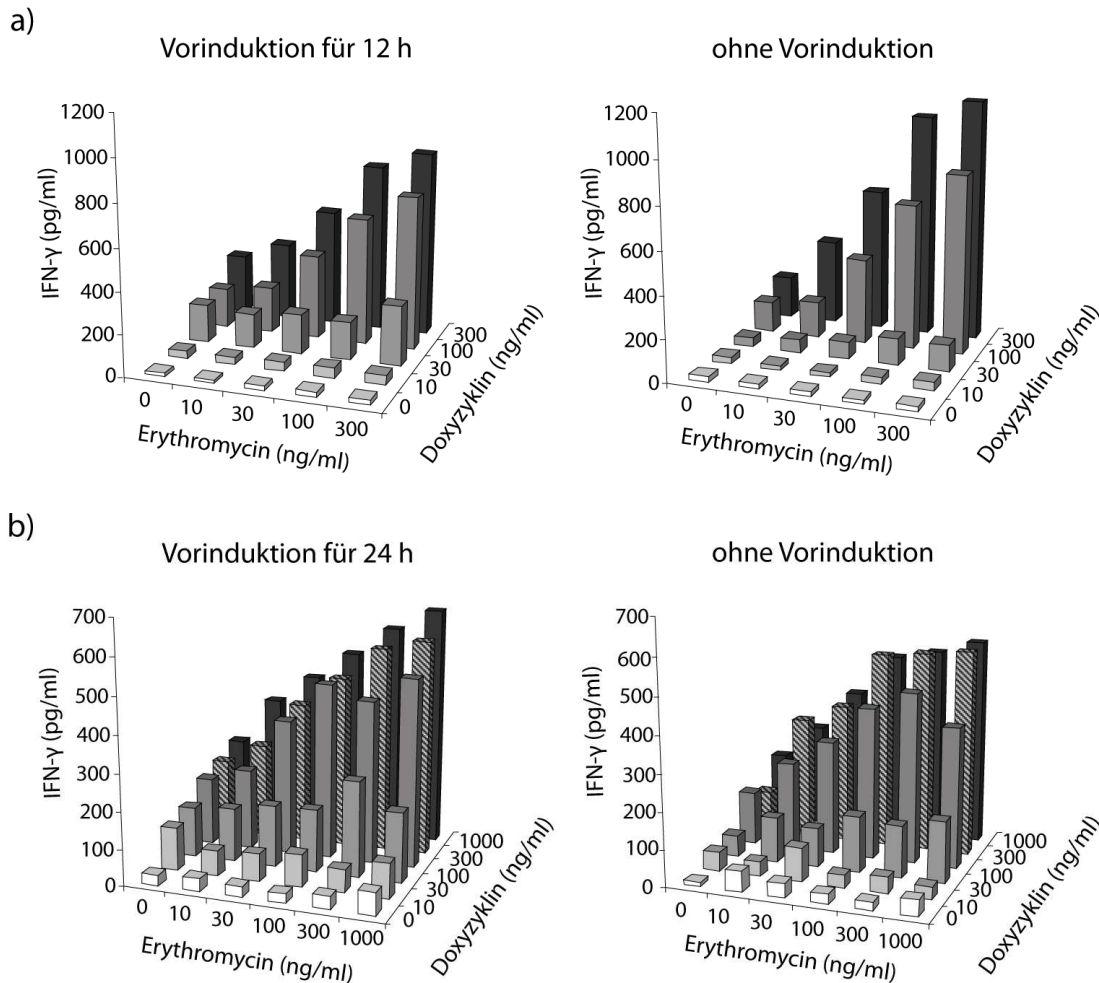


Abbildung 5.9: Auch ein zeitlich der Antigenexpression vorgeschalteter *knock-down* von Beclin-1 beeinträchtigt nicht signifikant die Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II

Raji-Tet-shBeclin-1-Ery-EBNA3C-Zellen wurden für 12 **(a)** bzw. 24 h **(b)** mit verschiedenen Konzentrationen an Doxzyklin behandelt. Anschließend wurde das Doxzyklin aus dem Medium ausgewaschen und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxzyklin und Erythromycin für weitere 36 h behandelt und danach für 20 h mit dem EBNA3C-spezifischen CD4+ T-Zellklon SLE3C kokultiviert. Die Menge an IFN- γ im Kulturüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.2.2 Weder die Überexpression von Wildtyp-Atg5 noch die Expression einer dominant-negativen Mutante haben Einfluss auf die Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II

Das Autophagie-assoziierte Genprodukt Atg5 bildet zusammen mit Atg16L1 und Atg12 einen Komplex, der für die Bildung von Autophagosomen essentiell ist (Munz, 2009). Um die Rolle von Atg5 bei der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation zu untersuchen, wurden die stabilen Transfektanten Raji-Tet-Atg5-Ery-EBNA3C und Raji-

Tet-dnAtg5-Ery-EBNA3C generiert. In der dominant negativen Form von Atg5 (dnAtg5) ist das Lysin an Aminosäureposition 130 zu Arginin mutiert (K130R) (Pyo et al., 2005). Die dnAtg5-Mutante ist nicht mehr in der Lage an Atg12 zu binden und verhindert so die Ausbildung von Autophagosomen (Dreux et al., 2009). In beiden Linien wurde die jeweilige Atg5-Form nur unter Zugabe von Doxyzyklin, und EBNA3C nur unter gleichzeitiger Behandlung mit Doxyzyklin und Erythromycin, exprimiert (Abbildung 5.10). Um die Präsentation von EBNA3C in diesen stabilen Transfektanten zu testen, wurden sie parallel zur Kontrolllinie Raji-Tet-Ery-EBNA3C (Abbildung 5.10a) mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und nach 36 h mit EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellen koinkubiert. In beiden Zelllinien erfolgte eine der Kontrolle vergleichbare Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II (Abbildung 5.10).

Die unterschiedlichen Transfektionsraten der drei stabilen Transfektanten in diesem Versuch können nicht die Ursache für den fehlenden Effekt von Atg5 bzw. dnAtg5 sein. In früheren Versuchen, in denen die Raji-Tet-Atg5-Ery-EBNA3C-Linie einen höheren Prozentsatz an transfizierten Zellen aufwies als die Kontrollzelllinie bzw. die dnAtg5-exprimierende Linie, wurde ebenfalls kein Unterschied in der Antigenpräsentation detektiert. Auch hatte die Vorinduktion von Atg5 bzw. dnAtg5 keinen signifikanten Einfluss auf die Antigenpräsentation (Daten nicht gezeigt).

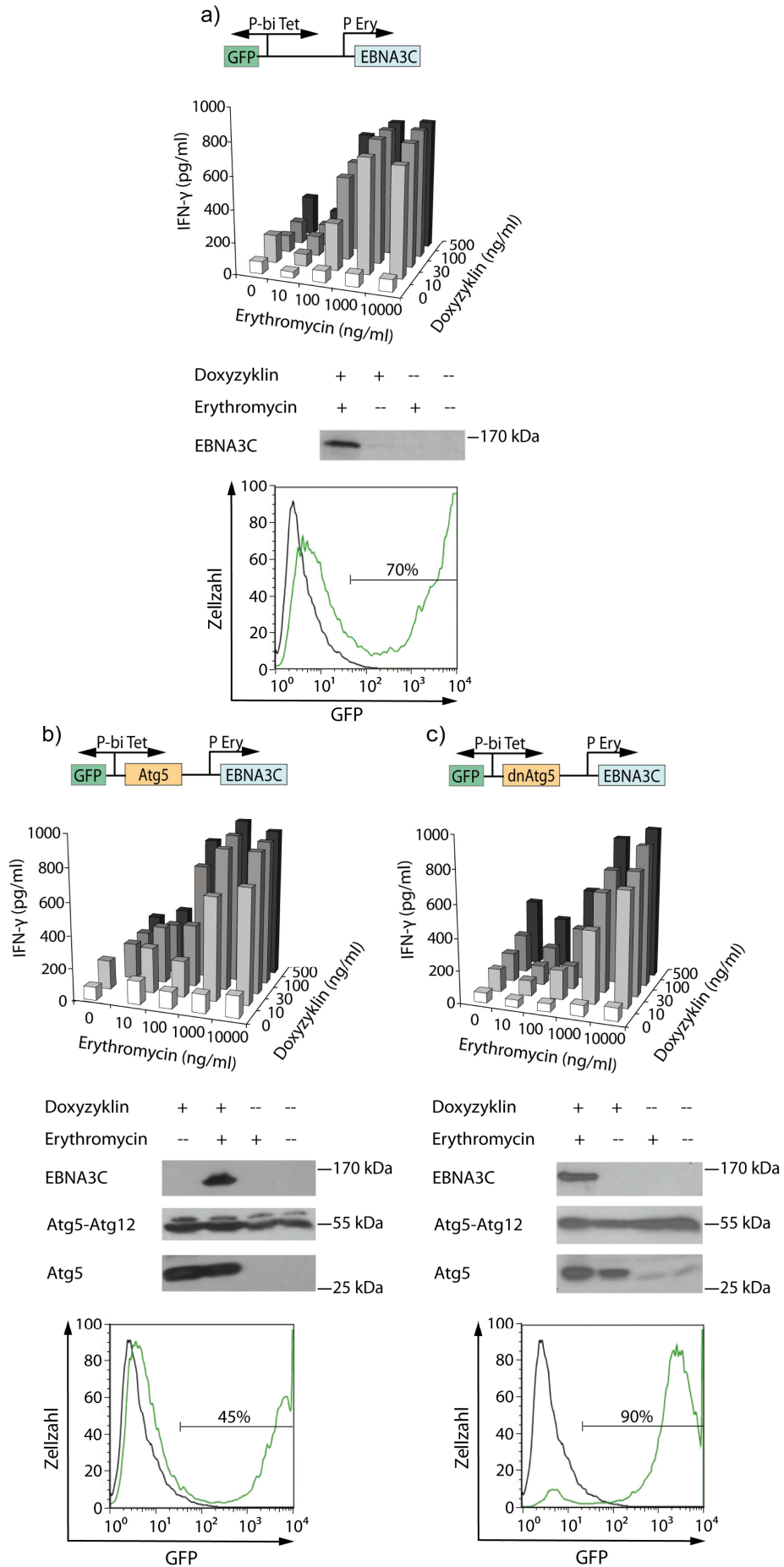


Abbildung 5.10: Die Präsentation von EBNA3C wird durch die gleichzeitige Expression von Atg5 oder einer dominant negativen Variante von Atg5 nicht beeinflusst

Die Kontrollzelllinie Raji-Tet-Ery-EBNA3C **(a)** sowie die stabilen Transfektanten Raji-Tet-Atg5-Ery-EBNA3C-Zellen **(b)** und Raji-Tet-dnAtg5-Ery-EBNA3C **(c)** wurden für 36 h mit den angegebenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und anschließend mit dem EBNA3C-spezifischen CD4+ T-Zellklon SLE3C für 20 h kokultiviert. Parallel dazu wurden die Zellen mit je 1000 ng/ml Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und die EBNA3C- und Atg5-Proteinmengen in den Raji-Tet-Atg5-Ery-EBNA3C-Zellen und den Raji-Tet-dnAtg5-Ery-EBNA3C-Zellen bestimmt. Der Anteil transfizierter Zellen wurde durch Behandlung der Zellen mit 1000 ng/ml Doxyzyklin und dem Nachweis der GFP+ Zellen nach 48 h durch eine FACS-Analyse bestimmt (grüne Kurve: mit Doxyzyklin induzierte Zellen; schwarze Kurve: unbehandelte Zellen). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Um den Einfluss von Atg5 und dnAtg5 auf die Makroautophagie zu überprüfen, wurden DG75-Zellen mit Expressionplasmiden für NeoR-GFP sowie für Atg5 bzw. dnAtg5 und, als Kontrolle, mit dem Leervektor kotransfiziert. NeoR und NeoR-GFP sind bekannte und anerkannte Autophagiesubstrate und der Nachweis von NeoR oder auch NeoR-GFP eine gängige Methode für die Quantifizierung von Autophagie (Nimmerjahn et al., 2003, Klionsky et al., 2008). Wie erwartet, kam es nach Behandlung der transfizierten Zellen mit 3-MA zu einer Akkumulation von NeoR-GFP, was sich in einem höheren Prozentsatz an GFP-positiven Zellen widerspiegelte (Abbildung 5.11). Dagegen war der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen sowohl in den Atg5 als auch den dnAtg5 transfizierten Zellen vermindert. Für Atg5 erwartet, war der verstärkte, Autophagie-assoziierte Abbau von NeoR-GFP durch dnAtg5 unerwartet. Vielmehr sollte es hier zu einer Inhibition von Autophagie und damit zu einer Anreicherung von NeoR-GFP kommen. Möglicherweise ist die im Kontext von Autophagie-induziertem Zelltod als dominant-negativ beschriebene K130R Mutante auf bestimmte Funktionen von Atg5 beschränkt.

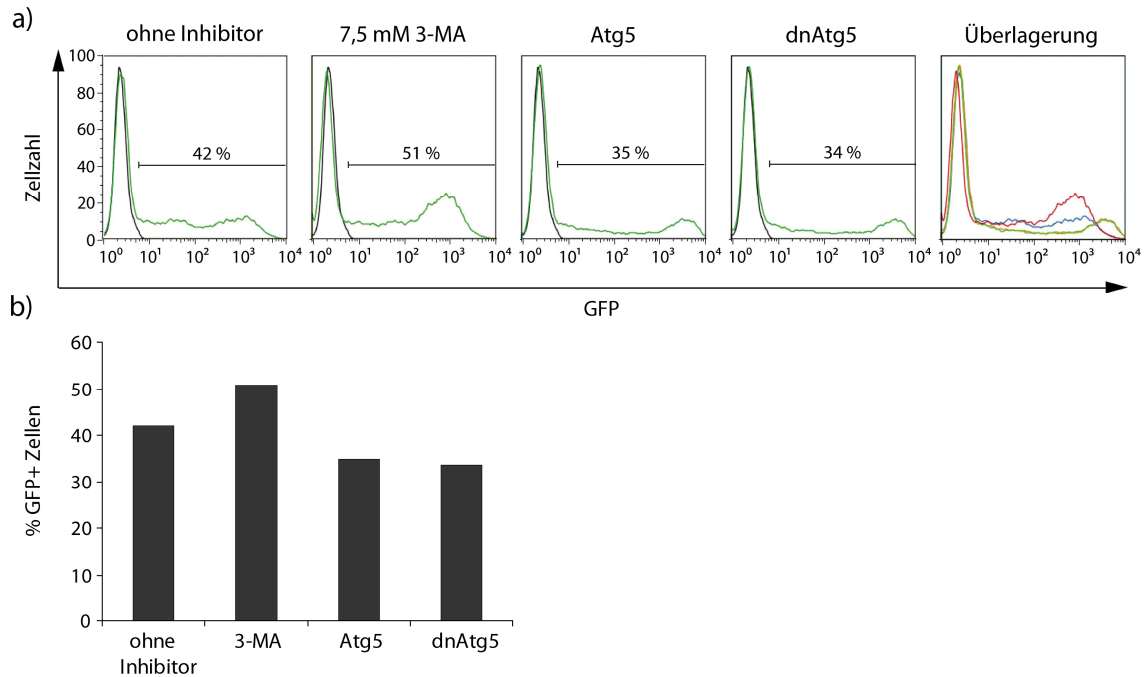


Abbildung 5.11: NeoR-GFP wird durch 3-MA stabilisiert und sowohl durch Atg5 als auch dnAtg5 destabilisiert

DG75-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid des Autophagiesubstrats NeoR fusioniert an GFP und einem Expressionsplasmid für Atg5, oder der dominant-negativen Mutante von Atg5 (dnAtg5) bzw. dem Leervektor, im Verhältnis 1:5 kotransfiziert und der Anteil an GFP+ Zellen nach 24 h im FACS gemessen. Als Positivkontrolle für die Inhibition von Autophagie wurde ein Teil der Zellen, die mit NeoR-GFP und dem Leervektor transfiziert worden waren, zusätzlich mit dem Autophagieinhibitor 3-Methyladenin (3-MA; 7,5 mM) behandelt. Die Behandlung mit 3-MA führte zu einer Stabilisierung von NeoR-GFP, was auf eine Hemmung von Autophagie durch diesen Inhibitor hindeutet. **a)** GFP-Histogramme der transfizierten Zellen (schwarze Linie: nicht transfizierte Zellen; grüne Linie: NeoR-GFP transfizierte Zellen; Überlagerung: blau: Leervektor; rot: 3-MA behandelte Zellen; orange: Atg5; grün: dnAtg5) **b)** Darstellung des Prozentsatzes an GFP+ Zellen im Diagramm. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

5.2.3 Die Inhibierung von mTORC1 oder mTORC2 führt nicht zu einer verstärkten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II

Die Serin/Threonin-Protein-Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Autophagie. mTOR im mTORC1 (*mTOR complex 1*) hemmt Autophagie, wobei mTOR unter Nährstoffmangel gehemmt wird und es dadurch zur Induktion von Makroautophagie kommt. Ob Autophagie auch über mTORC2 reguliert wird, ist bislang nicht bekannt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass mTORC2 über die Regulation von Akt, welche den mTOR-Repressor TSC2 phosphoryliert, Autophagie beeinflusst (Zhao et al., 2007, Mammucari et al., 2007).

Um nähere Einblicke in die Rolle von mTOR bei der Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II zu erhalten, sollte mTORC1 durch die mTORC1-Inhibitoren Rapamycin und das Rapamycin-Derivat Everolimus gehemmt werden. Um die höchste Konzentration der Inhibitoren zu bestimmen, bei dem noch keine unspezifischen, toxischen Effekte auftraten, wurde die lymphoblastoide Zelllinie JMZ-II mit steigenden Volumina an 10-fach konzentriertem Zellüberstand der EBV-Produzentenzelllinie B95.8 beladen und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Rapamycin bzw. Everolimus für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Inhibitoren ausgewaschen, die Zellen mit dem CD4+ gp350-spezifischen T-Zellklon gp1D6 kokultiviert und die sekretierte Menge an IFN- γ im ELISA gemessen. Die Viruspartikel werden über Endozytose aufgenommen und Antigene der Virushülle über den klassischen MHC-II-Präsentationsweg auf MHC-Klasse-II geladen. Da der klassische MHC-Klasse-II-Präsentationsweg nicht durch die mTOR-Inhibitoren beeinflusst werden sollte, konnte eine verminderte Antigenpräsentation nach Zugabe der Inhibitoren auf toxische Effekte zurückgeführt werden. Für Rapamycin wurde ab einer Konzentration von 100 nM und für Everolimus ab einer Konzentration von 10 nM eine Abnahme der T-Zellerkennung beobachtet (Abbildung 5.12). In der Literatur werden Rapamycin-Konzentrationen von 10 bis 500 nM zur Induktion von Autophagie eingesetzt (Boland et al., 2008, Nyfeler et al., 2011, Zhou et al., 2012)

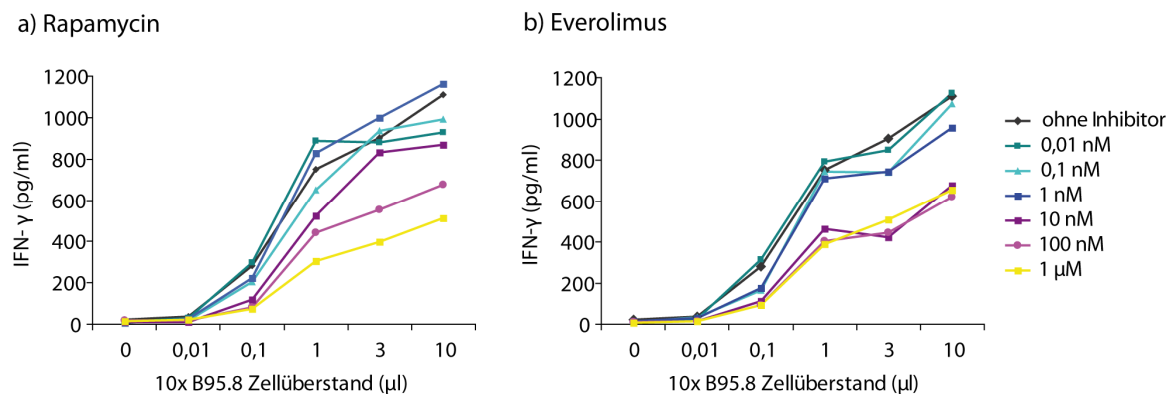


Abbildung 5.12: Rapamycin hemmt ab einer Konzentration von 100 nM und Everolimus ab einer Konzentration von 10 nM die Präsentation von exogenem Antigen auf MHC-II

5×10^4 LCL JMZ-II in 200 µl Kulturmedium wurden mit steigenden Volumina an 10-fach konzentriertem Überstand der Virus-produzierenden Zelllinie B95.8 beladen und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen der mTORC1-Inhibitoren Rapamycin (**a**) und Everolimus (**b**) behandelt. 24 h später wurden die Inhibitoren ausgewaschen, die Zellen mit dem gp350-spezifischen CD4+ T-Zellklon gp1D6 für 20 h kokultiviert und die IFN- γ -Ausschüttung durch die T-Zellen mittels ELISA bestimmt. Die Präsentation von gp350, einem Antigen der Virushülle, erfolgte in diesem Fall durch den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg und sollte durch

die mTOR-Inhibitoren nicht beeinflusst werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Fähigkeit der mTOR-Inhibitoren in den nicht-toxischen Konzentrationen Autophagie zu induzieren, wurde nach Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem NeoR-GFP-Expressionsplasmid, wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, untersucht. Nach Rapamycin-Behandlung wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der NeoR-GFP-Proteinmenge beobachtet, was auf eine Induktion von Autophagie schließen ließ. Eine Verminderung der NeoR-GFP-Proteinmenge durch Everolimus wurde mit den eingesetzten Konzentrationen allerdings nicht erzielt.

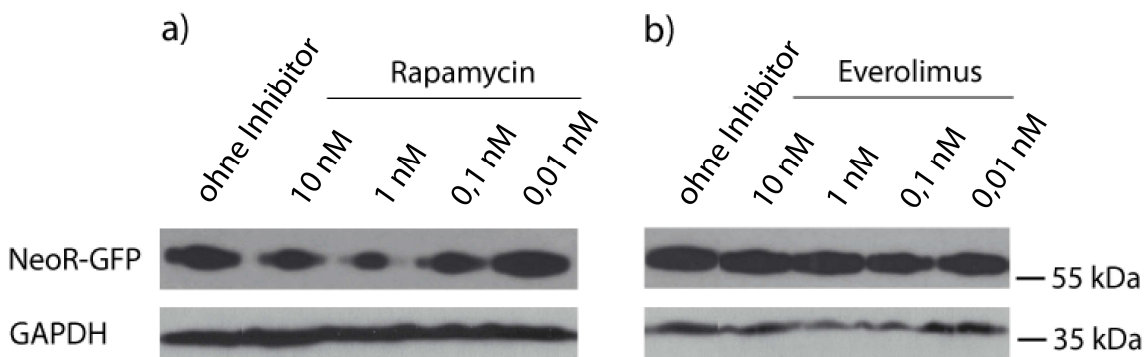


Abbildung 5.13: Rapamycin, nicht jedoch Everolimus, induziert in den nicht-toxischen Konzentrationen Autophagie

HEK293T-Zellen wurden mit einem NeoR-GFP-Expressionsplasmid transfiziert und für 24 h mit den angegebenen Mengen der mTOR-Inhibitoren Rapamycin **(a)** und Everolimus **(b)** behandelt. Anschließend wurde die NeoR-GFP Proteinmenge als Maß für Autophagie mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Das Haushaltsprotein GAPDH diente als Ladekontrolle.

Um den Einfluss der mTOR-Inhibitoren auf die Antigenpräsentation von intrazellulär lokalisierten Proteinen zu untersuchen, wurden EBV1.11-Zellen mit dem Pinco-NucNeoR-Expressionsplasmid transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Rapamycin und Everolimus für 24 h behandelt. Danach wurden die Inhibitoren ausgewaschen und NeoR-spezifische T-Zellen zugegeben. Die Behandlung mit 0,1 nM Rapamycin und 0,01 nM Everolimus führte zu einem leichten Anstieg der T-Zellerkennung, die mit höheren Konzentrationen aber wieder abnahm (Abbildung 5.14 a). Um die Rolle von mTOR mittels mTOR-spezifischer Inhibitoren noch weiter zu analysieren wurde die bereits im Labor vorhandene, stabile Transfektante GBAg-Tet-EBNA3C mit steigenden Konzentrationen an Doxzyklin behandelt und gleichzeitig unterschiedliche Mengen an Rapamycin oder Everolimus für 24 h zugesetzt.

Anschließend wurden die Inhibitoren ausgewaschen und die Zellen mit dem CD4+ EBNA3C-spezifischen T-Zellklon GB3C3H10 für 20 h koinkubiert. Durch die Behandlung der Zellen mit zuvor als nicht-toxisch nachgewiesenen Konzentrationen an mTOR-Inhibitoren wurde keine Verstärkung der Antigenpräsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II induziert (Abbildung 5.14 b).

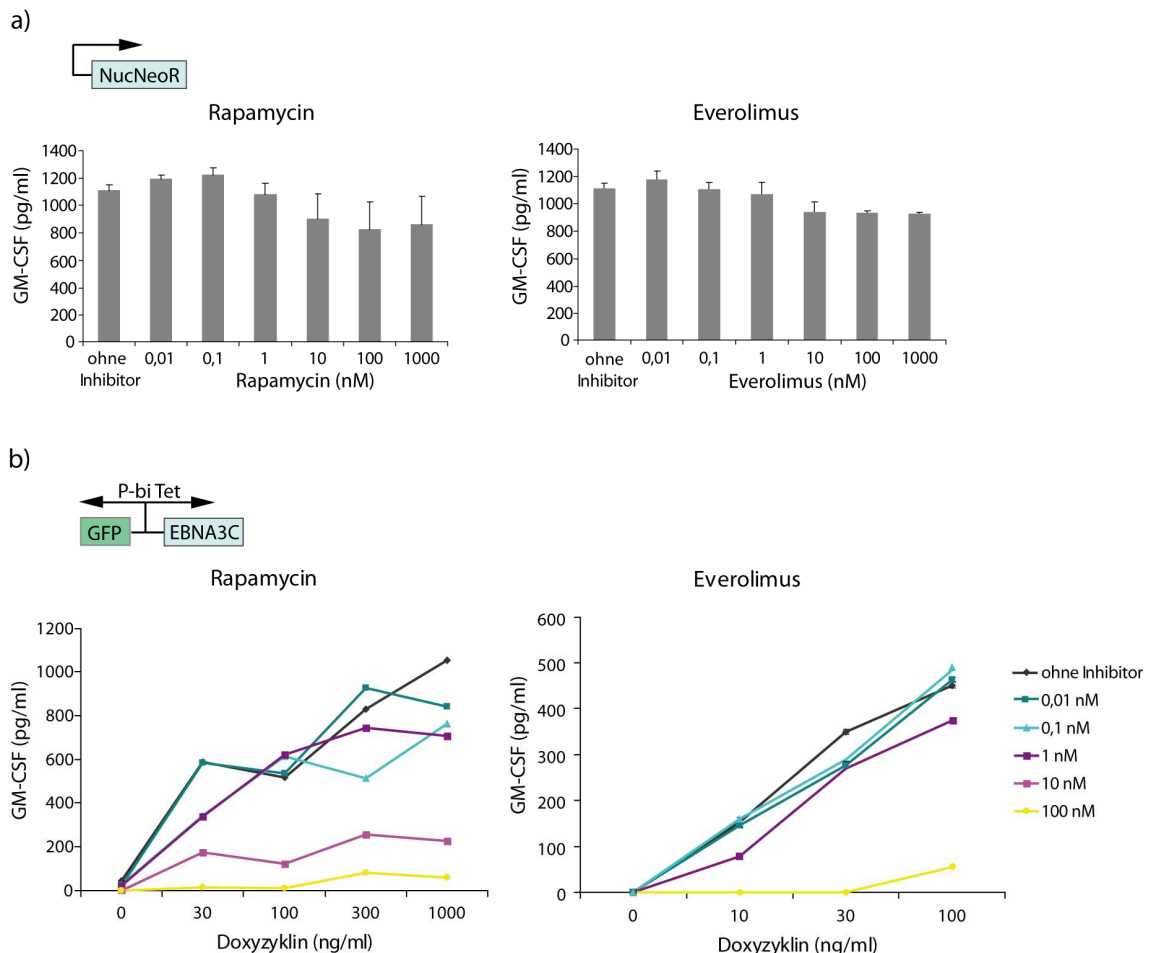


Abbildung 5.14: Die Behandlung der antigenpräsentierenden Zellen mit den mTOR-Inhibitoren Rapamycin und Everolimus führt nicht zu einer Verstärkung der Autophagie-abhängigen endogenen Präsentation auf MHC-II

a) EBV1.11-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für NucNeoR transfiziert und gleichzeitig mit steigenden Mengen an Rapamycin oder Everolimus für 24 h behandelt. Danach wurden die Inhibitoren ausgewaschen und die Zellen mit dem NeoR-spezifischen CD4+ T-Zellklon 20-4/A4 für 20 h kokultiviert. Die sekretierte Menge an GM-CSF wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatanalysen \pm Standardabweichung.

b) Die stabil transfizierte Zelllinie GBAG-Tet-EBNA3C wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Rapamycin bzw. Everolimus behandelt. 24 h später wurden die Inhibitoren ausgewaschen, die Zellen mit dem EBNA3C-spezifischen T-Zellklon GB3C3H10 für 20 h kokultiviert und anschließend die freigesetzte GM-CSF-Menge im ELISA ermittelt. Diese Versuche wurden dreimal unabhängig durchgeführt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Um den potentiellen Einfluss der beiden mTOR-Komplexe auf genetischer Ebene zu untersuchen, wurden stabile Transfektanten generiert, die entweder jeweils zwei Raptor-spezifische (Raji-Tet-shRaptor-Ery-EBNA3C), oder zwei Rictor-spezifische shRNAs (Raji-Tet-shRictor-Ery-EBNA3C) unter der Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors und das Antigen EBNA3C unter der Kontrolle des Erythromycin-induzierbaren Promotors exprimierten. Raptor ist die zentrale Komponente des mTORC1, von welchem bekannt ist, dass er Autophagie negativ reguliert. Rictor hingegen ist das zentrale Protein des mTORC2, dessen Einfluss auf Autophagie noch weitgehend unbekannt ist (Jung et al., 2010).

Da sich der Nachweis des endogenen Raptor-Proteins im Western Blot als schwierig erwies, wurde die Funktionalität der generierten Raptor-spezifischen shRNAs mit Hilfe eines Expressionsplasmids für ein 6xHis-Etikett tragendes Raptor-Protein in HEK293T-Zellen untersucht. Dazu wurde das Raptor-His-Expressionsplasmid zusammen mit steigenden Mengen an shRNA-Expressionsplasmid kotransfiziert und nach 48 h die Raptor-Proteinmengen mit Hilfe eines 6xHis-spezifischen Antikörpers bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze, in denen steigende Mengen eines Expressionsplasmids für Luciferase-spezifische shRNA kotransfiziert wurden. Raptor-spezifische, nicht jedoch Luciferase-spezifische shRNA, führte zu einer Abnahme der Raptor-His-Proteinmengen (Abbildung 5.15).

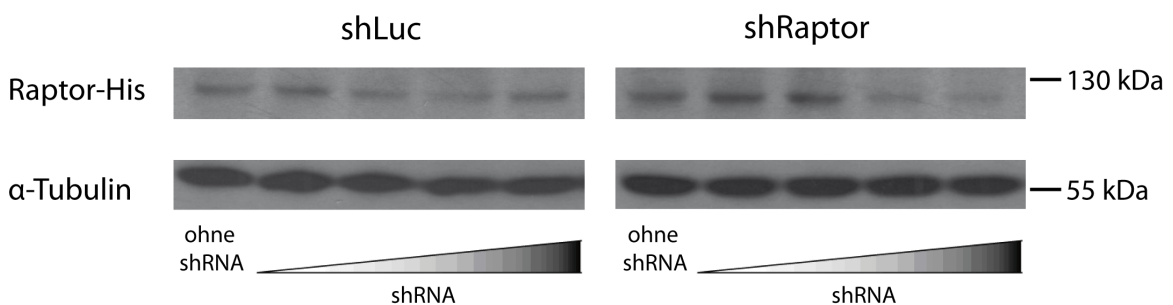


Abbildung 5.15: Die Expression Raptor-spezifischer shRNA, nicht jedoch einer gegen Luciferase gerichteten Kontroll-shRNA, führt zu einem *knock-down* von überexprimiertem Raptor in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden jeweils mit einer konstanten Menge eines Raptor-His- und steigenden Mengen eines Raptor-spezifischen bzw. Luciferase-spezifischen shRNA-Expressionskonstrukts transfiziert. Die Raptor-His-Proteinmengen wurden 36 h nach Transfektion mittels eines His-spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein α -Tubulin.

Die Funktionalität der Rictor-spezifischen shRNAs konnte nicht nachgewiesen werden, da das endogene Rictor-Protein in verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot nicht detektiert werden konnte und die Klonierung des großen offenen Leserahmens nicht gelang. Die Versuche wurden dennoch durchgeführt, um Hinweise auf eine mögliche Regulation der Antigenpräsentation durch den mTORC2 zu erhalten.

Allerdings wurde weder nach zeitgleicher noch nach zeitlich vorgeschalteter Expression der Raptor- bzw. Rictor-spezifischen shRNAs ein Einfluss auf die Präsentation des Modellantigens EBNA3C auf MHC-II beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ob hierfür eine fehlende/ungenügende Herunterregulation der jeweiligen Proteine, oder eine fehlende Beteiligung des jeweiligen Signalwegs verantwortlich war, kann nicht abschließend beurteilt werden.

5.3 Der *knock-down* von p62 in antigenpräsentierenden Zellen führt zu einer verringerten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II

Selektive Autophagie spielt eine Rolle bei der Beseitigung von Protein-Aggregaten, Peroxisomen, Ribosomen und auch Mitochondrien. Die Aufnahme dieser Aggregate und Organellen in Autophagosomen setzt ihre Ubiquitylierung und deren Bindung an Ubiquitin-Rezeptoren voraus. Einer dieser Rezeptoren ist p62/SQSTM1. Über die C-terminale UBA-Domäne (*ubiquitin associated domain*) bindet p62 an polyubiquitylierte Proteine (Kraft et al., 2010). Die N-terminale PB1 (*Phox and Bem 1 domain*)-Domäne führt zur Polymerisierung von p62 und kann außerdem andere Proteine, die ebenfalls PB1-Domänen enthalten, binden (Donaldson et al., 2003). p62 bindet über die LC3 interagierende Region (LIR) an LC3 als ein Adaptor, der ubiquitylierte Proteinaggregate in die Autophagiemaschinerie einschleust (Kraft et al., 2010).

Um die Frage zu klären, ob selektive Autophagie von polyubiquitylierten Proteinen über die Bindung an p62 einen Beitrag zur Antigenpräsentation leistet, wurden zwei p62-spezifische shRNAs generiert und beide zusammen in den pRTR-Tet-Ery-Vektor unter die Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promotors kloniert. Die Funktionalität wurde in stabil transfizierten Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Zellen mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 5.16).

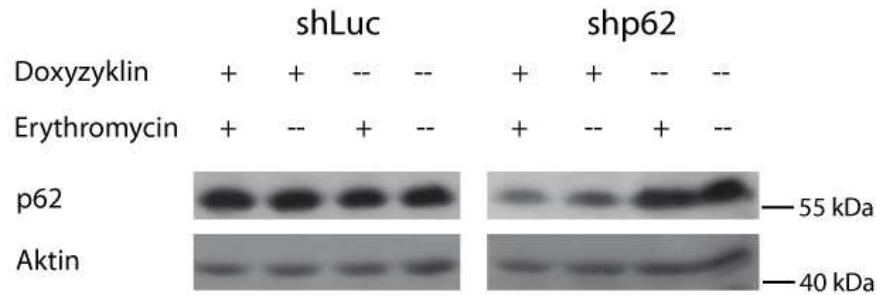


Abbildung 5.16: Doxyzyklin-regulierter *knock-down* von p62 in stabil transfizierten Raji-Zellen

Raji-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C-Zellen bzw. Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Zellen wurden, wie angegeben, mit jeweils 1000 ng/ml Doxyzyklin und/oder Erythromycin für 24 h behandelt und anschließend die p62-Proteinexpression mittels Western Blot nachgewiesen. Aktin diente als Ladekontrolle.

Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Zellen und, als Kontrolle, Raji-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C-Zellen wurden, entweder mit oder ohne 24-stündiger Vorinduktion mit Doxyzyklin, mit steigenden Mengen an Doxyzyklin und Erythromycin behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit EBNA3C-spezifischen CD4+ T-Zellen für 20 h kokultiviert. Im Vergleich zur Kontrollzelllinie war die Erkennung der Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Zellen durch die T-Zellen stark verringert (Abbildung 5.17). Diese Ergebnisse wiesen auf eine Rolle von p62-vermittelter, selektiver Autophagie bei der endogenen Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II hin. Auch in der Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Linie wurde die Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängige Expression von EBNA3C nachgewiesen (Abbildung 5.17 c). Der Nachweis des EBNA3C-Proteins in der Kontrollzelllinie Raji-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C wurde zeitnah erbracht (Abbildung 5.8 a).

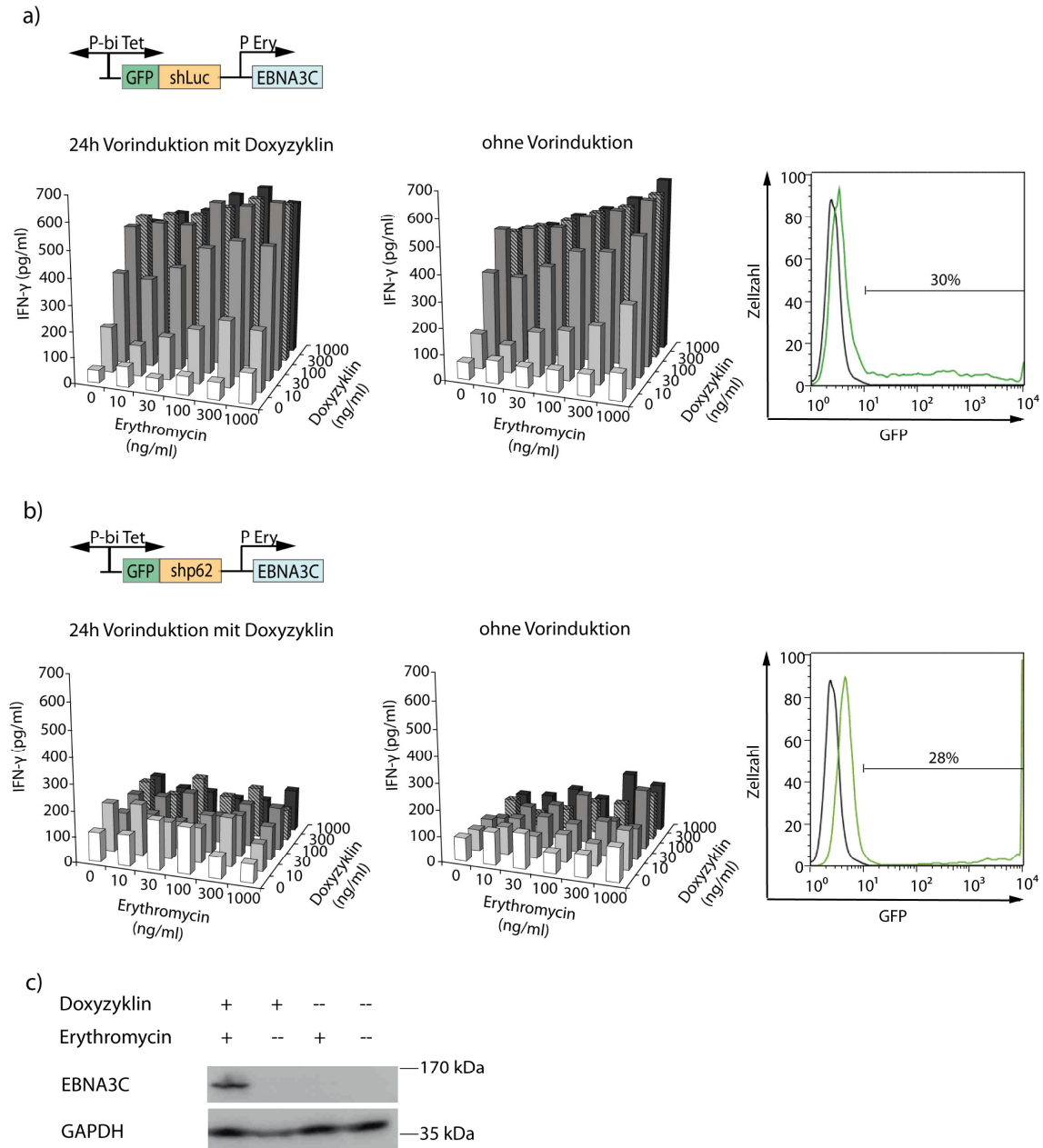


Abbildung 5.17: Der *knock-down* von p62 hemmt die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II

a) und **b)** Die Kontrollzelllinie Raji-Tet-shLuc-Ery-EBNA3C (**a**) sowie Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Zellen (**b**) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxyzyklin für 24 h behandelt. Anschließend wurde das Doxyzyklin ausgewaschen und die Zellen mit verschiedenen Mengen an Doxyzyklin und Erythromycin versetzt und für weitere 36 h inkubiert. Danach erfolgte eine 20-stündige Kokultur mit dem CD4⁺ EBNA3C-spezifischen T-Zellklon SLE3C. Die von den T-Zellen freigesetzte Menge an IFN- γ wurde mittels ELISA gemessen. Der Anteil transfizierter Zellen wurde durch Behandlung der Zellen mit 1000 ng/ml Doxyzyklin und dem Nachweis der GFP⁺ Zellen nach 48 h durch eine FACS-Analyse bestimmt (grüne Kurve: mit Doxyzyklin induzierte Zellen; schwarze Kurve: unbehandelte Zellen). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. **c)** Die Expression von EBNA3C in Raji-Tet-shp62-Ery-EBNA3C-Zellen wurde nach Behandlung der Zellen mit je 1000 ng/ml Doxyzyklin und Erythromycin mittels Western Blot nachgewiesen.

Um noch weitere Hinweise für eine Rolle von p62 bei der Autophagie-assoziierten Antigenpräsentation zu erhalten und um auszuschließen, dass die geringere Antigenpräsentation von EBNA3C nach Expression von shRNA gegen p62 auf das Auswachsen einer Sublinie mit veränderten Eigenschaften oder verminderter EBNA3C-Induzierbarkeit beruhte, sollte der Effekt des *knock-downs* von p62 auf die Präsentation eines weiteren Antigens untersucht werden. Dazu wurden Expressionsplasmide für das Antigen BRLF1 generiert. Gegen dieses Antigen standen HLA-A2-restringierte CD8+ und HLA-DR13-restringierte CD4+ T-Zellen zur Verfügung. Dadurch konnte in der Burkitt-Lymphomzelllinie DG75 (HLA-A2+, DR13+) die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II parallel untersucht werden. Aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz bot die Zelllinie DG75 zudem den Vorteil, dass stabile Linien relativ schnell und ohne Puromycin-Selektion etabliert werden konnten. Dadurch wurde, im Gegensatz zu den vorher durchgeführten Versuchen, das Auswachsen von Sublinien mit veränderten Eigenschaften weitgehend ausgeschlossen. Um zunächst zu überprüfen, ob BRLF1 Autophagie-abhängig auf MHC-II präsentiert wird, wurden DG75-Tet-Ery-BRLF1-Zellen für 24 h mit 300 ng/ml Doxyzyklin und, in An- oder Abwesenheit von 7,5 mM 3-MA, mit steigenden Mengen an Erythromycin behandelt. Anschließend wurden sie nach Auswaschen des Inhibitors mit dem BRLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 koinkubiert. Ähnlich wie zuvor bei NucNeoR und EBNA3C, war auch die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-II in Anwesenheit von 3-MA stark vermindert (Abbildung 5.18).

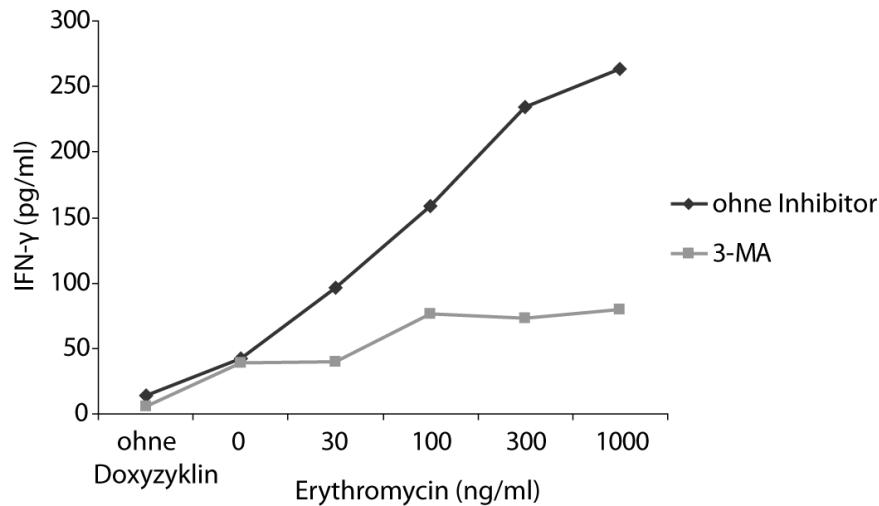


Abbildung 5.18: Die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-II wird durch den PI3K-Inhibitor 3-MA gehemmt

DG75-Zellen wurden mit dem Tet-Ery-BRLF1-Plasmid transfiziert und die Antigenexpression durch Zugabe von 300 ng/ml Doxyzyklin und steigenden Mengen an Erythromycin für 24 h induziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 24 h mit dem PI3K-Inhibitor 3-MA (7,5 mM) behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen gewaschen und mit dem BRLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 kokultiviert. Nach 20 h erfolgte die Messung der IFN- γ -Sekretion durch die T-Zellen im ELISA. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Um den Einfluss der p62-spezifischen shRNA auf die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-I und Klasse-II zu untersuchen, wurden DG75-Tet-shp62-Ery-BRLF1-Zellen generiert. Diese wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin behandelt und 36 h später mit dem CD4+ BRLF1-spezifischen T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 bzw. mit der CD8+ BRLF1-spezifischen T-Zelllinie Rp5 für weitere 20 h kokultiviert. Da in den Versuchen mit den stabil transfizierten Raji-Zellen die Ansätze mit und ohne Vorinduktion der shRNA gegen p62 keinen Unterschied in der Antigenpräsentation zeigten, wurde in weiteren Versuchen auf eine Vorinduktion verzichtet. Als Kontrolle wurden parallel dazu Versuche mit DG75-Tet-shLuc-Ery-BRLF1- und auch DG75-Tet-shBeclin1-Ery-BRLF1-Zellen durchgeführt, da, wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt, die Antigenpräsentation durch die Expression von shRNA gegen Beclin-1 nicht beeinflusst wurde. Wie in Abbildung 5.19 zu sehen, wurde die Antigenpräsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-II in DG75-Zellen ebenfalls durch die Expression p62-spezifischer shRNA herunterreguliert, während die Präsentation auf MHC-Klasse-I nahezu unverändert blieb. Eine verminderte Antigenpräsentation auf MHC-II aufgrund unspezifischer oder toxischer Effekte der p62-spezifischen shRNA erschien demnach unwahrscheinlich.

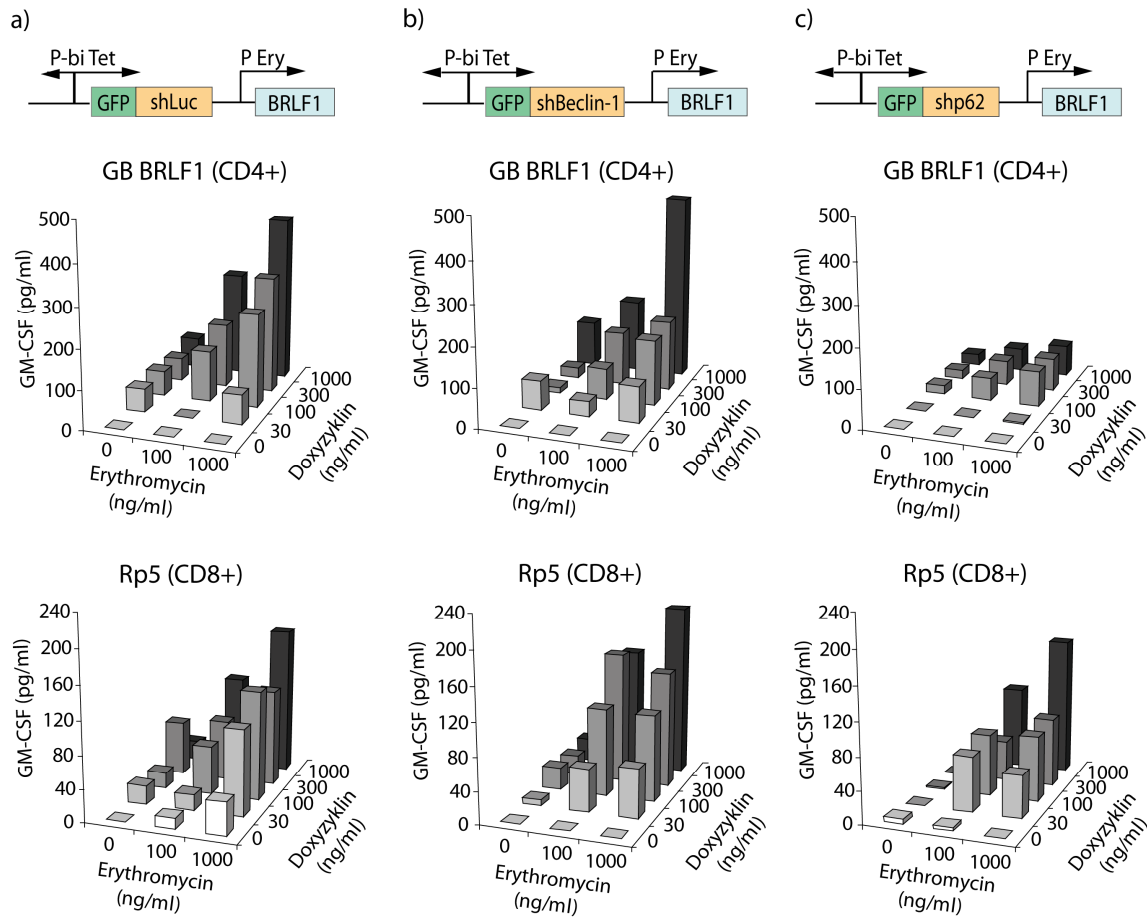


Abbildung 5.19: Der *knock-down* von p62 führt zu einer verminderten Präsentation von BRLF1 auf MHC-II, aber nicht auf MHC-I

DG75-Tet-shLuc-Ery-BRLF1-Zellen **(a)**, DG75-Tet-shBeclin1-Ery-BRLF1-Zellen **(b)** und DG75-Tet-shp62-Ery-BRLF1-Zellen **(c)** wurden für 36 h mit unterschiedlichen Mengen an Doxzyklin und Erythromycin versetzt und anschließend entweder mit dem BRLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 oder der BRLF1-spezifischen CD8+ T-Zelllinie Rp5 für 20 h kokultiviert. Anschließend wurde die GM-CSF-Sekretion durch die T-Zellen im ELISA nachgewiesen. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche T-Zellerkennung auf Unterschieden in der BRLF1-Expression beruhte, wurden die drei Zelllinien mit jeweils 300 ng/ml Doxzyklin und 1000 ng/ml Erythromycin behandelt und nach 48 h Zellextrakte hergestellt. Die anschließend im Western Blot nachgewiesenen Proteinmengen erklärten nicht die unterschiedliche T-Zellerkennung. Obwohl äquivalente Mengen an BRLF1 in shp62- und shBeclin-1 exprimierenden Zellen vorhanden waren, wurden die Zellen unterschiedlich gut von den CD4+ T-Zellen erkannt. Dagegen war die BRLF1-Proteinmenge in der shLuc exprimierenden Zelllinie erhöht, diese Zellen wurden aber nicht besser erkannt als die shBeclin-1 exprimierende Zelllinie (Abbildung 5.20).

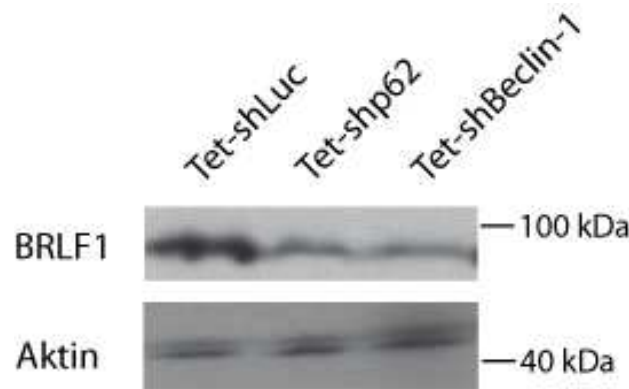


Abbildung 5.20: Die CD4⁺ T-Zellerkennung korreliert nicht mit der BRLF1-Proteinmenge

DG75-Tet-shLuc-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-shp62-Ery-BRLF1-Zellen und DG75-Tet-shBeclin-1-Ery-BRLF1-Zellen wurden für 48 h mit 300 ng/ml Doxzyklin und 1000 ng/ml Erythromycin behandelt. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt und mittels Western Blot Analyse die BRLF1-Proteinmengen untersucht.

5.4 Die Präsentation von Antigen auf MHC-Klasse-I versus MHC-Klasse-II wird durch verschiedene Ubiquitin-mutanten unterschiedlich beeinflusst

Da in den vorangegangenen Versuchen der *knock-down* von p62 zu einer verminderten Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II führte, sollte in folgenden Experimenten die Abhängigkeit der Antigenpräsentation von Ubiquitin bzw. verzweigtem Polyubiquitin untersucht werden.

Bei der Ubiquitinylierung wird enzymatisch eine Isopeptid-Bindung zwischen einem Lysin des Zielproteins und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins ausgebildet. Ubiquitin selber enthält sieben Lysine, über die weitere Ubiquitinmoleküle an ein bereits gebundenes Ubiquitin angehängt und so über mindestens sieben verschiedene Verbindungsarten Ubiquitinketten gebildet werden können (Pickart, 2001). Je nach Art und Anzahl der Ubiquitin-Bindungen werden Halbwertszeit, Funktion oder Lokalisation von Zielproteinen reguliert.

Über Lysin 48 (K48) verkettete Proteine werden bevorzugt dem proteasomalen Abbau zugeführt. Neuere Arbeiten weisen zudem darauf hin, dass eine Polyubiquitinylierung von Proteinen an K63 die selektive Degradation von falsch gefalteten Proteinen oder defekten Mitochondrien durch Autophagie fördert (Narendra et al., 2008, Kraft et al., 2010). Zudem wurde gezeigt, dass p62 in vivo präferentiell an K63-Polyubiquitin bindet (Long et al., 2008). Möglicherweise können Substrate über differentielle Ubiquitinylierung somit entweder in den proteasomalen oder in den autophagischen

Degradationsweg geschleust werden. Auch wurde anhand des MHC-Klasse-I-Moleküls gezeigt, dass eine K63-Polyubiquitylierung als Signal für Endozytose und auch für die Sortierung in den endolysosomalen Degradationsweg dienen kann (Duncan et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob die Aufnahme in den Autophagie-abhängigen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg eine Ubiquitylierung der Modellantigene voraussetzt, wurden Ubiquitin-Mutanten, in welchen entweder das Lysin 48 (Ub-K48R) oder das Lysin 63 zu Arginin (Ub-K63R) mutiert worden war, unter die Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promotors kloniert. Diese Ubiquitinmutanten können nicht mehr über Lysin 48 bzw. 63 im Ubiquitinprotein vernetzt werden. Als Kontrolle diente Wildtyp-Ubiquitin (Ubiquitin). Die generierten stabilen Transfektanten Raji-Tet-Ubiquitin-Ery-EBNA3C, Raji-Tet-Ub-K48R-Ery-EBNA3C und Raji-Tet-Ub-K63R-Ery-EBNA3C wurden für 36 h mit steigenden Mengen an Doxyzyklin und Erythromycin versetzt und anschließend für 20 h mit dem EBNA3C-spezifischen T-Zellklon SLE3C kokultiviert. Im Vergleich zu Wildtyp- oder Ub-K48R-exprimierenden Zellen war die T-Zellerkennung der Ub-K63R-exprimierenden Linie deutlich vermindert (Abbildung 5.21). Da alle drei stabil transfizierten Zelllinien über 90% GFP-positive Zellen und äquivalente Mengen an EBNA3C-Protein enthielten, waren hierfür nicht unterschiedliche Transfektions- oder Antigenexpressionsraten verantwortlich (Abbildung 5.22).

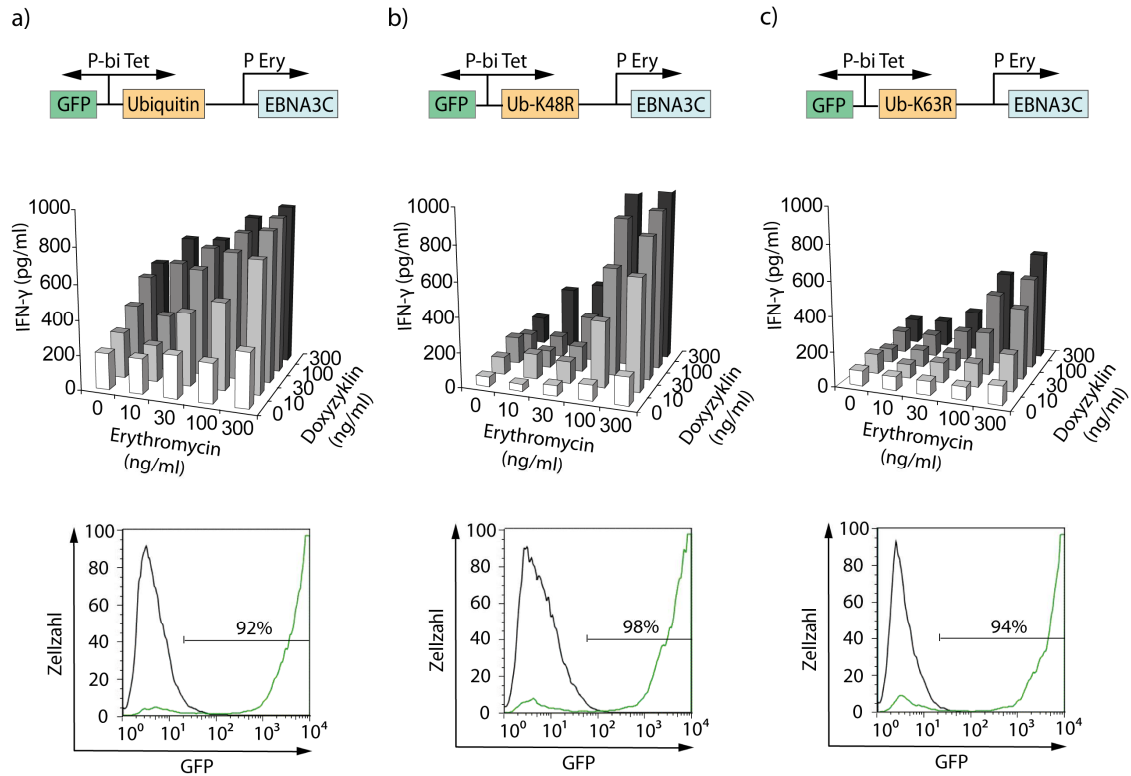


Abbildung 5.21: Die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II wird durch die Ubiquitin K63R-Mutante inhibiert

Raji-Tet-Ubiquitin-Ery-EBNA3C-Zellen **(a)**, Raji-Tet-UbK48R-Ery-EBNA3C-Zellen **(b)** und Raji-Tet-UbK63R-Ery-EBNA3C-Zellen **(c)** wurden für 36 h mit den angegebenen Mengen an Doxzyklin und Erythromycin versetzt und anschließend mit dem EBNA3C-spezifischen CD4+ T-Zellklon SLE3C für 20 h kokultiviert. Die durch die T-Zellen sekretierte Menge an IFN- γ wurde danach im ELISA bestimmt. Parallel dazu wurden die Zellen mit je 1000 ng/ml Doxzyklin und Erythromycin behandelt und der Anteil transfizierter GFP+ Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt (grüne Kurve: mit Doxzyklin induzierte Zellen; schwarze Kurve: unbehandelte Zellen). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

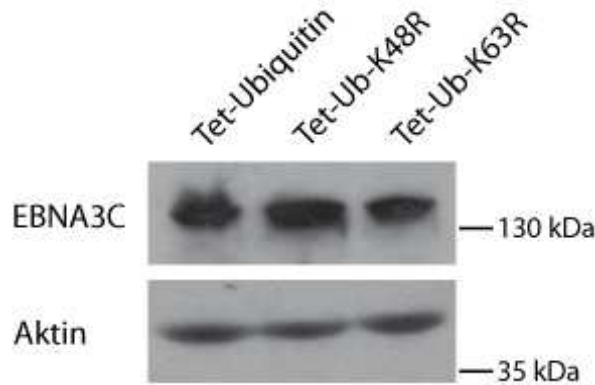


Abbildung 5.22: EBNA3C wird in allen Ubiquitin-Transfektanten ähnlich hoch exprimiert -

Raji-Tet-Ubiquitin-Ery-EBNA3C-Zellen, Raji-Tet-Ub-K48R-Ery-EBNA3C-Zellen und Raji-Tet-Ub-K63R-Ery-EBNA3C-Zellen wurden für 36 h mit je 300 ng/ml Doxyzyklin und Erythromycin versetzt. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt und die EBNA3C-Proteinmengen mittels Western Blot Analyse bestimmt.

Um diese Ergebnisse mit einem weiteren Modellantigen zu verifizieren und um zusätzlich zu untersuchen, ob Ub-K48-markierte Proteine präferentiell in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg gelangen, wurden Plasmide mit dem Antigen BRLF1 unter der Kontrolle des Erythromycin-abhängigen Promotors generiert. Dies ermöglichte erneut die gleichzeitige Analyse der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I und Klasse-II mittels Koinkubation mit CD8+ und CD4+ BRLF1-spezifischen T-Zellen. Zusätzlich wurde in diesen Versuchen der Effekt einer Ubiquitinmutante getestet, in der alle Lysine zu Arginin mutiert worden waren (Ub-K1-7) und somit gar keine Verkettung über Lysinreste mehr erfolgen konnte.

Auch die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-II wurde durch die Expression der K63R-Ubiquitinmutante inhibiert, während die K48R-Mutante hierauf keinen Einfluss zeigte. Erstaunlicherweise hatte die Expression der Ubiquitinvollmutante (K1-7) keinen inhibitorischen Effekt auf die MHC-Klasse-II-Präsentation (Abbildung 5.23). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Ubiquitin-unabhängige Induktion von Autophagie als kompensatorischer Effekt bei Inhibierung des UPS (*ubiquitin proteasom system*) durch die Überexpression der Ubiquitinvollmutante (Pandey et al., 2007). Denkbar wäre auch eine verminderte Erkennung und damit Aktivierung dieser Mutante durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1.

GB BRLF1 1H3 (CD4+)

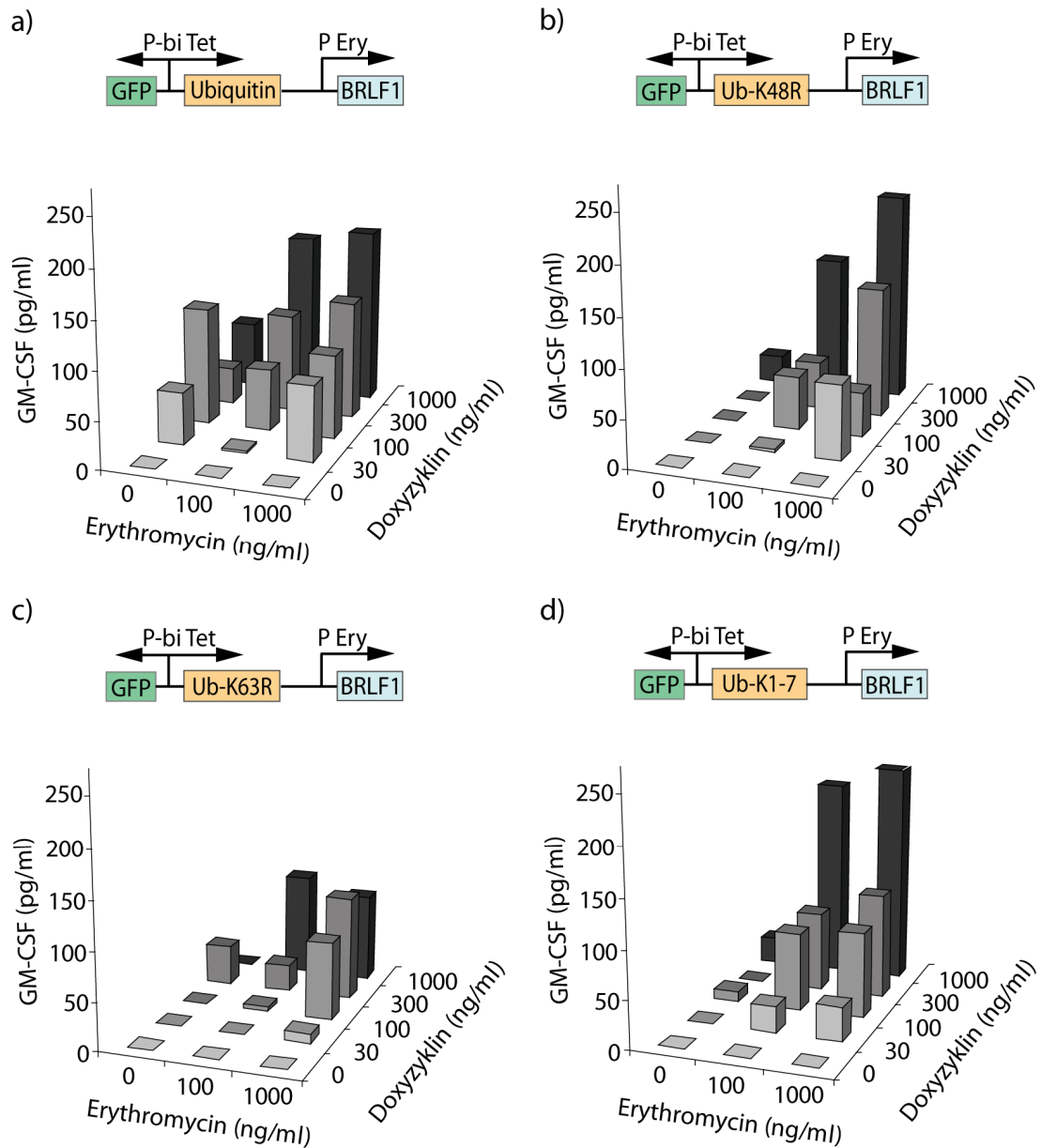


Abbildung 5.23: Die endogene Präsentation von BRLF1 auf MHC-II wird durch die K63R-Ubiquitinmutante inhibiert

DG75-Tet-Ubiquitin-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-Ub-K48R-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-Ub-K63R-Ery-BRLF1-Zellen und DG75-Tet-Ub-K1-7-Ery-BRLF1-Zellen wurden für 36 h mit unterschiedlichen Mengen an Doxzyklin und Erythromycin versetzt und anschließend mit dem BRLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 für 20 h kokultiviert. Als Maß der T-Zellerkennung wurde anschließend die Menge an GM-CSF im Kulturüberstand ermittelt. In dieser Abbildung ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

Dagegen zeigte die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-I ein genau umgekehrtes Bild. Sie wurde durch die Expression der Mutanten Ub-K48R und UbK1-7 inhibiert, aber nicht durch die Expression von Ub-K63R (Abbildung 5.24).

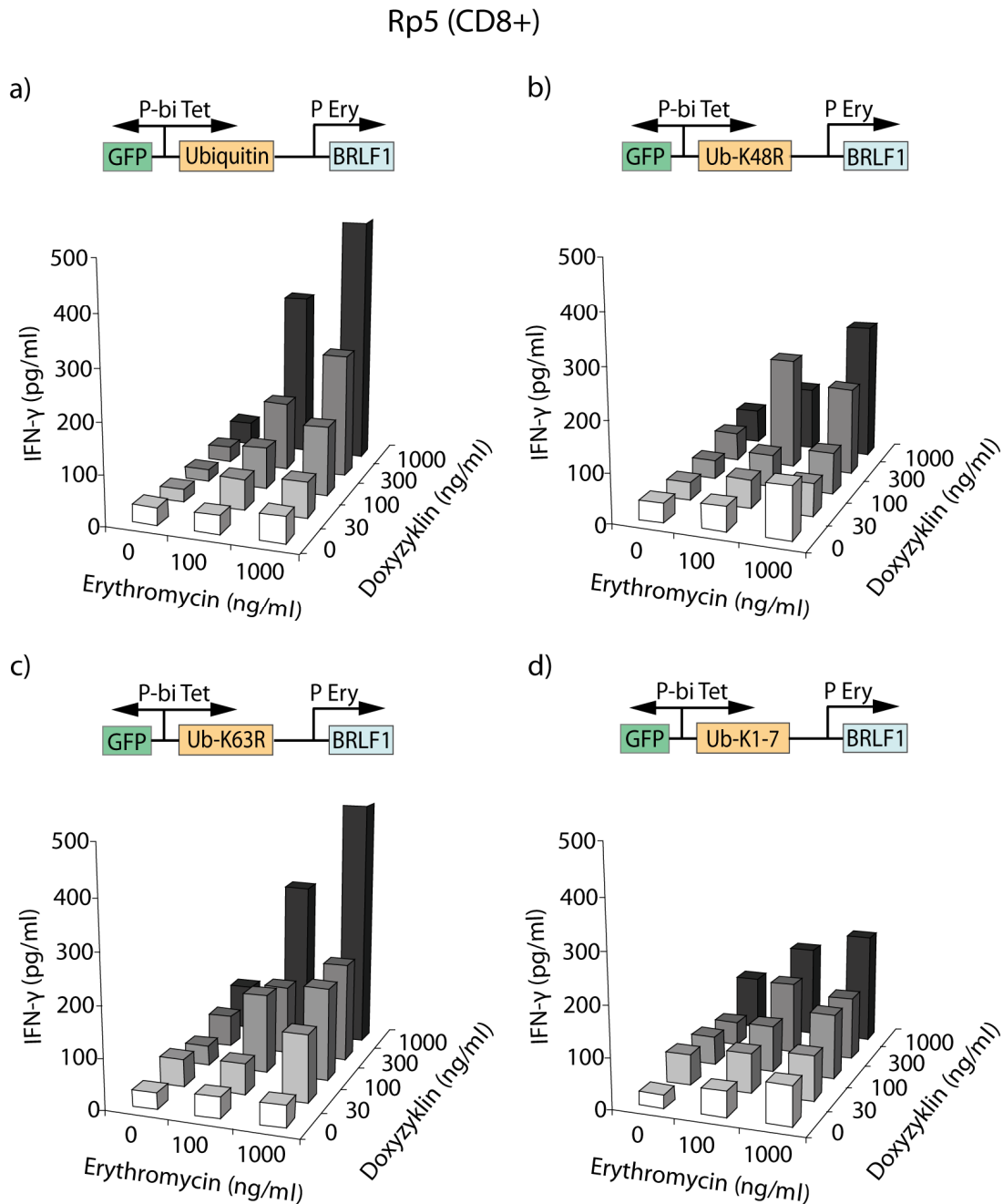


Abbildung 5.24: Die Präsentation von BRLF1 auf MHC-I wird durch die K48R- und die Ub-K1-7-Ubiquitinmutanten, nicht jedoch durch die Ubiquitinmutante Ub-K63R inhibiert

DG75-Tet-Ubiquitin-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-Ub-K48R-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-Ub-K63R-Ery-BRLF1-Zellen und DG75-Tet-Ub-K1-7-Ery-BRLF1-Zellen wurden für 36 h mit den angegebenen Mengen an Doxyzyklin und Erythromycin induziert und danach mit der BRLF1-spezifischen CD8+ T-Zelllinie Rp5 für 20 h kokultiviert. Mittels ELISA wurde anschließend die

Menge an sezerniertem IFN- γ im Kulturüberstand gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

In allen vier Zelllinien wurden ähnliche Mengen an BRLF1-Protein detektiert (Abbildung 5.25).

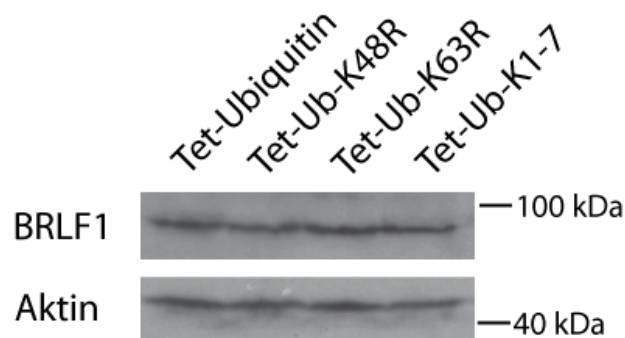


Abbildung 5.25: BRLF1 wird in allen Ubiquitin-Transfektanten ähnlich hoch exprimiert

DG75-Tet-Ubiquitin-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-Ub-K48R-Ery-BRLF1-Zellen, DG75-Tet-Ub-K63R-Ery-BRLF1-Zellen bzw. DG75-Tet-Ub-K1-7-Ery-BRLF1-Zellen wurden für 24 h mit je 1000 ng/ml Doxzyklin und Erythromycin behandelt. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt und die BRLF1-Proteinmengen mittels Western Blot Analyse bestimmt. Aktin diente als Ladekontrolle.

Um diese Ergebnisse noch weiter zu untermauern, wurden Antigenpräsentationsversuche nach transienter Transfektion von DG75-Zellen durchgeführt. Neben einer schnelleren und einfacheren Analyse verschiedener Versuchsbedingungen wurde auch erhofft, im Vergleich zu den konditionalen Vektoren höhere Expressionsraten der Ubiquitinmutanten zu erzielen. Da die Vektor-kodierten Ubiquitin-Varianten gegen endogenes WT-Ubiquitin konkurrieren, waren Effekte der transfizierten Ubiquitinmutanten auf die Antigenpräsentation nur bei sehr hoher Expressionsrate zu erwarten. DG75-Zellen wurden jeweils mit Expressionsplasmiden für BRLF1 und einer Ubiquitinmutante im Verhältnis 1:10 kotransfiziert und 48 h später mit den CD4⁺ oder CD8⁺ BRLF1-spezifischen T-Zellen für weitere 20 h kokultiviert. Die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-I wurde in diesen Versuchen ebenfalls durch die Mutanten K48R und K1-7 inhibiert, jedoch durch die Expression der Mutante K63R erhöht (Abbildung 5.26 b). Für die MHC-Klasse-II-Präsentation war ein deutlicher Anstieg durch die Expression der K48R-Mutante zu sehen und eine deutliche Abnahme durch die Expression der K63R-Mutante (Abbildung 5.26 a). In diesen Experimenten verminderte auch die Expression der UbK1-7-Mutante die Präsentation auf MHC-Klasse-II. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Präsentation eines

Antigens auf MHC-Klasse-II versus MHC-Klasse-I durch die Expression verschiedener Ubiquitinmutanten in verschiedene Richtungen verschoben werden kann: durch die Expression von UbK48R wird das Gleichgewicht in Richtung MHC-Klasse-II-Präsentation verschoben, während die Expression von Ub-K63R es in Richtung MHC-Klasse-I-Präsentation verschiebt. Dies könnte darauf hinweisen, dass für die Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II die gleichen Antigenpools zur Verfügung stehen und die Inhibierung eines Präsentationsweges zu einer Verstärkung des jeweils anderen Präsentationsweges führt. Als Kontrolle für diese Versuche wurden weitere Mutanten von Ubiquitin generiert, in denen jeweils eines der fünf weiteren Lysine zu Arginin mutiert wurde (Ub-K6R, Ub-K11R, Ub-K27R, Ub-K29R, Ub-K33R). Analog zu oben beschriebenen Versuchen wurde der Effekt dieser Mutanten auf die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-II (Abbildung 5.26 c) und MHC-Klasse-I (Abbildung 5.26 d) nach transienter Transfektion in DG75-Zellen analysiert. In verschiedenen, unabhängig durchgeführten Versuchen zeichnete sich keine Beeinflussung der Antigenpräsentation durch die Ubiquitinmutanten Ub-K6R, Ub-K11R, Ub-K27R und Ub-K33R ab. Lediglich die Mutante Ub-K29R führte zu einer erhöhten Antigenpräsentation sowohl auf MHC-Klasse-I als auch auf MHC-Klasse-II (Abbildung 5.26 c und d). In allen Transfektanten konnte BRLF1 nachgewiesen werden (Abbildung 5.26 e). Lediglich nach Kotransfektion von Ub-K1-7 wurden nur sehr geringe BRLF1-Proteinmengen detektiert. Dies könnte womöglich die verminderte Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II (mit-)verursacht haben.

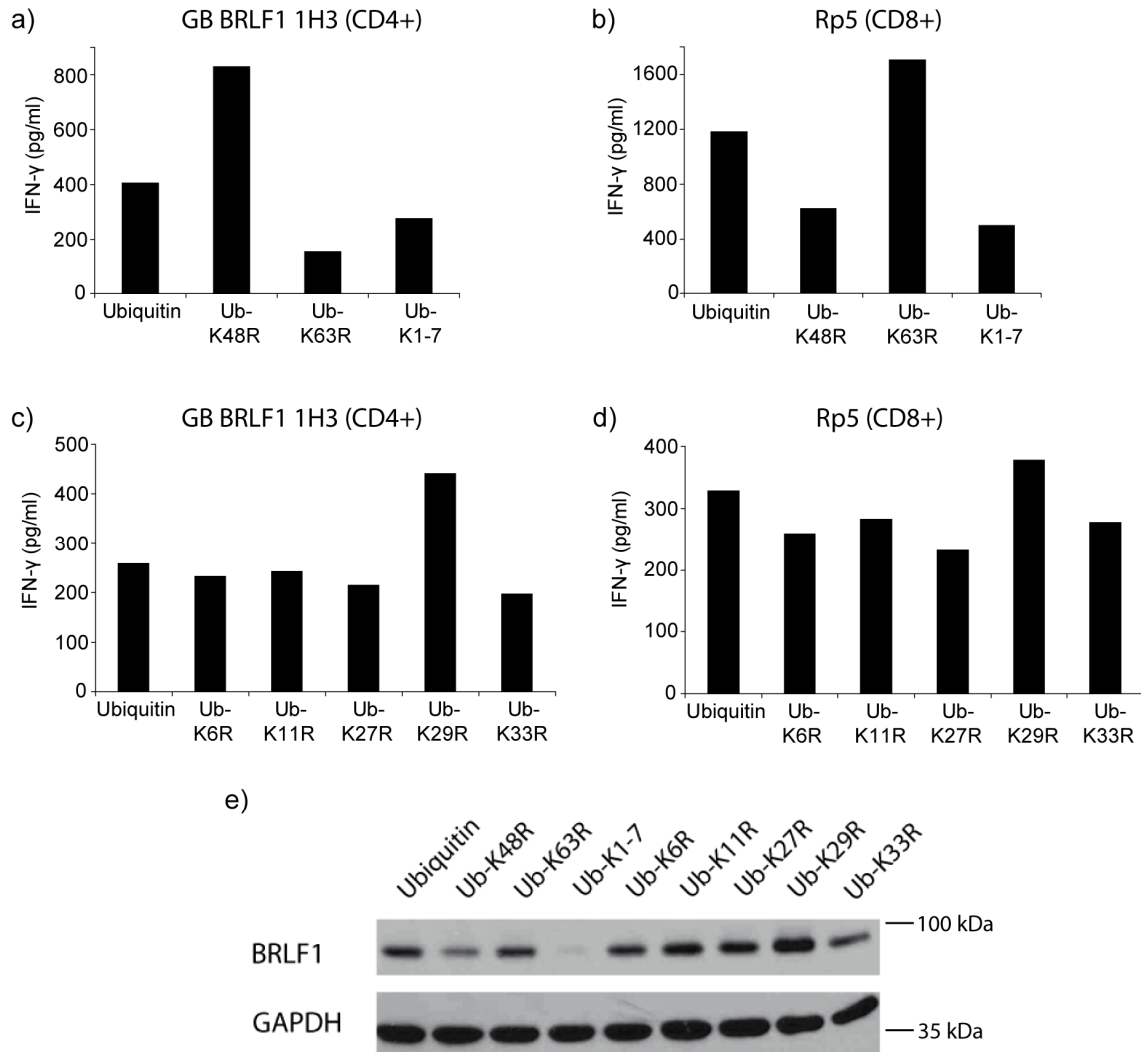


Abbildung 5.26: Die Ubiquitinmutanten Ub-K48R und Ub-K63R haben gegensätzliche Effekte auf die endogene Präsentation von BRLF1 auf MHC-I und MHC-II

DG75 wurden mit Expressionsplasmiden für BRLF1 und jeweils einer Ubiquitinmutante im Verhältnis 1:10 kotransfiziert. 48 h später wurden die Zellen entweder mit dem CD4+ BRLF1-spezifischen T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 (**a** und **c**) oder mit der CD8+ BRLF1-spezifischen T-Zelllinie Rp5 (**b** und **d**) kokultiviert und die IFN-γ-Sekretion durch die T-Zellen im ELISA gemessen. **e**) Parallel dazu wurden Zelllysate der transfizierten Zellen hergestellt. Der Nachweis der BRLF1-Protein-Expression erfolgte mittels Western Blot Analyse. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von je drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die unterschiedliche Modulation der Antigenpräsentation durch die K48R- und K63R-Ubiquitinmutanten warf die Frage auf, ob hierfür die Ubiquitinylierung der Antigene oder von Komponenten des Präsentationsweges verantwortlich war. Um zu untersuchen, ob durch die verschiedenen Ubiquitinmutanten die Expression der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche verändert wurde und dies womöglich der Grund für die sichtbaren Effekte auf die Antigenpräsentation waren, wurden DG75-Zellen einzeln mit

den verschiedenen Ubiquitinmutanten transfiziert und nach 48 h mit dem BRLF1-YVL-Peptid, welches auf HLA-A2 von der CD8+ T-Zelllinie Rp5 erkannt wird, oder mit dem gp350-Peptid, welches auf HLA-DR13 von dem CD4+ gp350-spezifischen T-Zellklon gp1D6 erkannt wird, in unterschiedlichen Mengen für 2 h beladen. Anschließend wurden die Peptide gründlich aus dem Kulturmedium ausgewaschen und die Zellen mit den jeweiligen T-Zellen für 20 h koinkubiert. Die verschiedenen Ubiquitinmutanten beeinflussten die Antigenerkennung durch die T-Zellen nicht signifikant (Abbildung 5.27 a und b). Jedoch muss bei diesem Versuch bedacht werden, dass nur etwa 30-50% der Zellen mit den Plasmiden transfiziert wurden. Somit wiesen mehr als die Hälfte der eingesetzten Zellen potentiell keine Modulation der MHC-Expression auf, was womöglich in einer unverminderten Stimulation der T-Zellen resultierte. Deshalb wurde zusätzlich eine FACS-Analyse der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I und Klasse-II durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich zu den Ubiquitin-Expressionsplasmiden ein Reporterplasmid für GFP (im Falle der Untersuchung der MHC-Klasse-I-Expression, Abbildung 5.27 c) oder dsRed (im Falle der Untersuchung der MHC-Klasse-II-Expression, Abbildung 5.27 d) kotransfiziert und nur die transfizierten (GFP+ bzw. dsRed+) Zellen analysiert. Auch in diesen Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf eine Modulation der MHC-Expression durch die verschiedenen Ubiquitinmutanten (Abbildung 5.27 c und d). Als Kontrolle wurden ebenfalls die untransfizierten Zellen auf ihre MHC-Oberflächenexpression hin untersucht und mit den transfizierten Zellen verglichen, wobei auch hier keine Unterschiede detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).

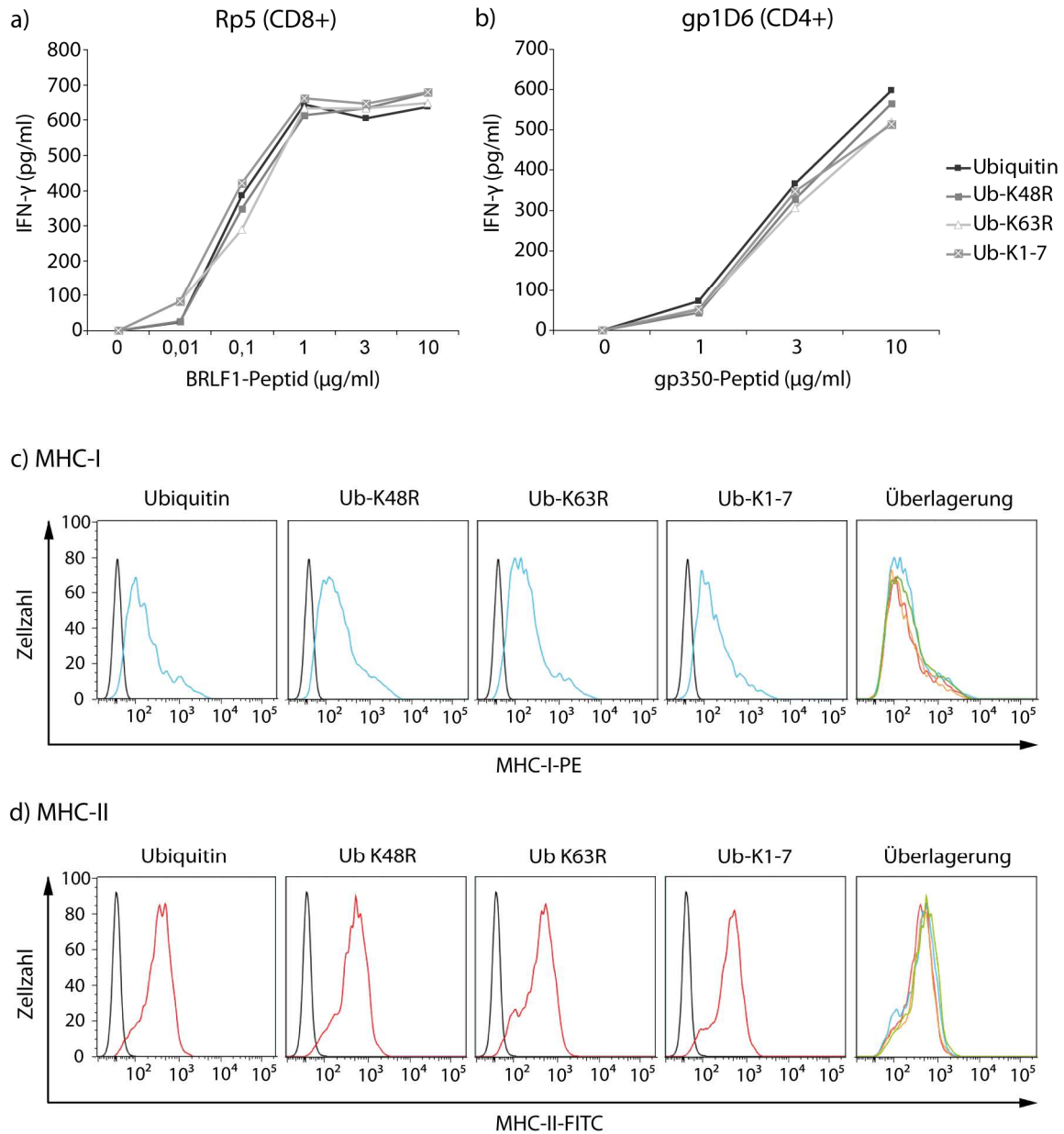


Abbildung 5.27: Die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression werden nicht wesentlich durch die Expression der verschiedenen Ubiquitinmutanten beeinflusst

DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden der Ubiquitinmutanten Ub-K48R, Ub-K63R und Ub-K1-7 sowie Wildtyp-Ubiquitin (Ubiquitin) transfiziert und anschließend mit dem BRLF1-YVL-Peptid **(a)**, welches auf HLA-A2 bindet und von der BRLF1-spezifischen T-Zelllinie Rp5 erkannt wird, bzw. dem gp350-Peptid **(b)**, welches auf HLA-DRB1*1301 präsentiert und von dem gp350-spezifischen T-Zellklon gp1D6 erkannt wird, in verschiedenen Konzentrationen für 2 h beladen. Die Peptide wurden anschließend aus dem Zellkulturmedium ausgewaschen und die Zellen mit den jeweiligen T-Zellen koinkubiert. Die sekretierte Zytokinmenge durch die T-Zellen als Maß für die Antigenpräsentation wurde 20 h später im ELISA ermittelt. Es ist je ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt. **c)** DG75-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid einer der angegebenen Ubiquitinmutanten bzw. WT-Ubiquitin und einem Expressionsplasmid für GFP im Verhältnis 5:1 kotransfiziert. 48-72 h später wurden die Zellen mit einem PE-markierten MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörper (IgG2a; blaue Linie) bzw. einer PE-markierten IgG2a Isotypkontrolle (schwarze Linie) für eine

anschließende FACS-Analyse gefärbt. Dargestellt sind Histogramme von Zellen, welche zuvor in der Analyse als lebend und GFP-positiv (transfiziert) definiert worden waren. **d)** DG75-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid einer Ubiquitinmutante bzw. WT-Ubiquitin und einem Expressionsplasmid für dsRed im Verhältnis 5:1 kotransfiziert. 48-72 h später wurden die Zellen mit einem FITC-markierten MHC-Klasse-II-spezifischen Antikörper (IgG2a; rote Linie) bzw. einer FITC-markierten IgG2a-Isotypkontrolle (schwarze Linie) für eine anschließende FACS-Analyse gefärbt. Dargestellt sind Histogramme von Zellen, welche zuvor in der Analyse als lebend und dsRed-positiv (transfiziert) definiert worden waren.

Um überdies hinaus zu untersuchen, ob die Überexpression der Ubiquitinmutanten auch einen Einfluss auf den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg hat, wurden DG75-Zellen mit Expressionsplasmiden jeweils einer Ubiquitinmutante sowie dem extrazellulären Teil des NGF-R im Verhältnis 8:1 kotransfiziert und 48 h später die transfizierten Zellen mittels NGF-R-spezifischer Antikörper und der MACS-Technologie angereichert. Die Zellen wurden anschließend mit unterschiedlichen Mengen an BRLF1-Protein für 24 h beladen. Danach wurde überschüssiges Protein aus dem Medium ausgewaschen und die Zellen mit dem BRLF1-spezifischen T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 kokultiviert. Exogen verabreichtes BRLF1-Protein wird über Endozytose aufgenommen und gelangt in den klassischen MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg. Die Expression der Ubiquitinmutanten hatte keinen deutlichen Effekt auf die Prozessierung von BRLF1 durch diesen Degradationsweg (Abbildung 5.28). Der beschriebene Effekt von K63-verkettetem Polyubiquitin auf den endozytotischen Prozess, welcher bei dem klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg eine Rolle spielt, konnte durch die vorliegenden Ergebnisse folglich nicht bestätigt werden (Duncan et al., 2006). Allerdings muss auch bei diesen Versuchen bedacht werden, dass die Zellpopulation trotz Anreicherung immer noch 10-30% nicht-transfizierte Zellen enthielt, welche womöglich nachweisbare Effekte der Ubiquitin-Mutanten kaschierten.

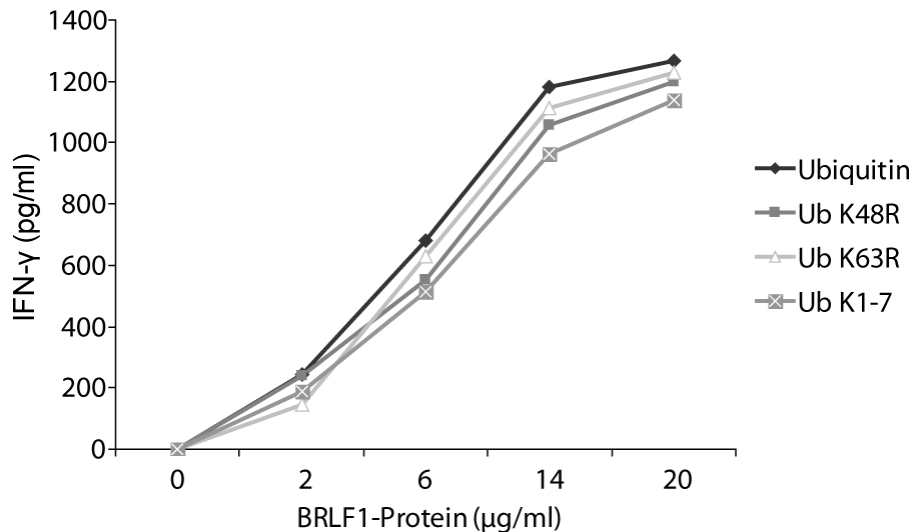


Abbildung 5.28: Die Präsentation von exogenem BRLF1 auf MHC-II wird durch die Expression der verschiedenen Ubiquitinmutanten nicht beeinflusst

DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für jeweils eine Ubiquitinmutante sowie den extrazellulären Teil des NGF-R im Verhältnis 8:1 kotransfiziert. 48 h später wurden die erfolgreich transfizierten Zellen mittels NGF-R-spezifischer Antikörper und der MACS-Technologie angereichert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an BRLF1-Protein versetzt und überschüssiges Protein 24 h später aus dem Medium ausgewaschen. Durch Koinkubation mit dem BRLF1-spezifischen CD4+ T-Zellklon GB-BRLF1-1H3 und anschließender Messung der Zytokinfreisetzung durch die T-Zellen im ELISA wurde der Einfluss der Ubiquitinmutanten auf den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg getestet. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

5.5 Die Präsentation auf MHC-Klasse-II setzt keine Ubiquitinylierung des Antigens voraus

5.5.1 Die im Vergleich zu NeoR verbesserte Präsentation von NucNeoR auf MHC-II beruht nicht auf seiner nukleären Lokalisation

Wie schon in früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, wird die nukleäre Form von NeoR (NucNeoR) besser auf MHC-Klasse-II präsentiert als die zytosolische Variante (NeoR). Bislang wurde angenommen, dass die nukleäre Lokalisation das Protein vor dem Abbau durch zytosolische Proteasen schützt und deshalb größere Antigenmengen zur Präsentation zur Verfügung stehen. In Anbetracht der eigenen Ergebnisse könnte auch das Vorhandensein mehrerer Lysine im nukleären Lokalisationssignal als potentielle Ubiquitinylierungsstellen für einen besseren Abbau über Autophagie und damit für die verbesserte Präsentation auf MHC-II verantwortlich sein. Um die erste Hypothese zu überprüfen, wurde die

Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) von NucNeoR, bestehend aus der triplizierten NLS des SV40 large T Antigen, so mutiert, dass die Signalsequenz nicht mehr funktionell war. Hierfür wurde das zweite Lysin der Signalsequenz PKKKRKVG zu Asparagin mutiert, wodurch die Sequenz PKNKRKVG entstand (Lanford and Butel, 1984). Eine Übersicht über die verschiedenen NeoR-Varianten ist in Abbildung 5.29 d dargestellt. Die NeoR-Variante mit der mutierten SV40-NLS (Nuc-mutNeoR) wurde, wie auch die anderen Varianten, an GFP fusioniert und die subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie 24 h nach Transfektion in HEK293T-Zellen überprüft. Während NucNeoR ausschließlich im Zellkern lokalisiert war, wurde Nuc-mutNeoR genau wie NeoR im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen (Abbildung 5.29).

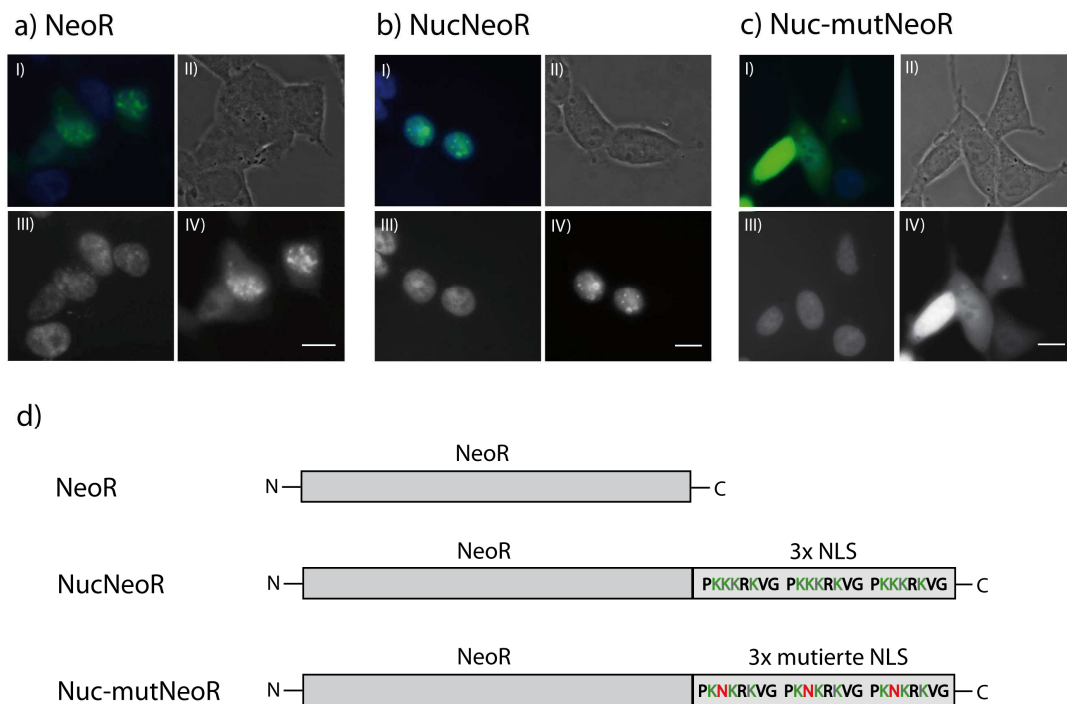


Abbildung 5.29: NeoR und Nuc-mut-NeoR sind im Zytoplasma und NucNeoR im Zellkern lokalisiert

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden der verschiedenen NeoR-GFP-Fusionsvarianten transfiziert und 24 h später die subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gezeigt sind durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen (II), die DAPI Färbung des Zellkerns (III) und die NeoR-Lokalisation mittels GFP-Nachweis (IV). Bild I) zeigt eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (III+IV). **a)** NeoR wurde sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen **b)** NucNeoR war ausschließlich im Zellkern lokalisiert (3x SV40-NLS PKKKRKVG) **c)** NeoR mit mutierter Kernlokalisationssequenz (3x mutierte SV40-NLS PKNKRKVG) war im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert. Größenbalken: 10 µm **d)** Übersicht über die verschiedenen NeoR-Varianten.

Die Präsentation der verschiedenen NeoR-Varianten wurde durch Kotransfektion der jeweiligen Pinco-NeoR-Plasmide mit dem Pinco-HLA-DPB1*0301 in DG75-Zellen und anschließender Koinkubation mit dem NeoR-spezifischen CD4+ T-Zellklon 20-4/A4 getestet. Wie in Abbildung 5.30 zu sehen, wurde Nuc-mutNeoR genauso gut präsentiert wie NucNeoR. Dieses Ergebnis zeigte, dass nicht die nukleäre Lokalisation von NucNeoR für die bessere Präsentation verantwortlich war. Vielmehr müssen andere Eigenschaften oder das Vorhandensein der NLS an sich hierfür verantwortlich sein.

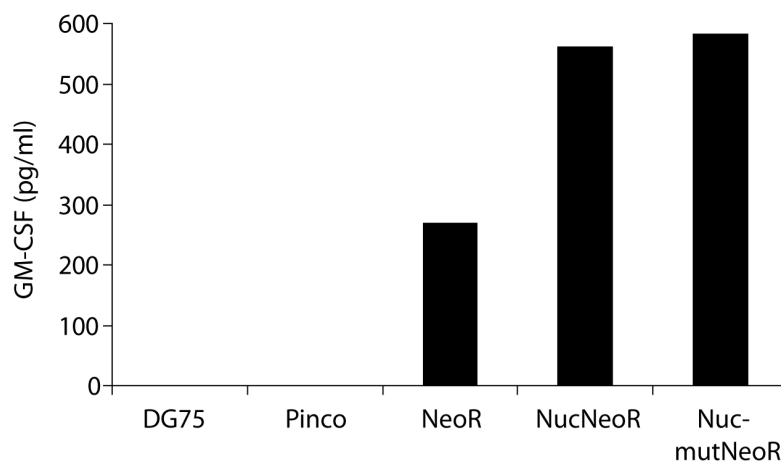


Abbildung 5.30: Die NeoR-Variante mit mutierter Kernlokalisationssequenz wird ähnlich effizient auf MHC-Klasse-II präsentiert wie NucNeoR

DG75 wurden mit Expressionsplasmiden für HLA-DPB1*0301 sowie jeweils einer NeoR-Variante kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für weitere 20 h mit dem NeoR-spezifischen CD4+ T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Die GM-CSF-Ausschüttung durch die T-Zellen wurde anschließend als Maß der Antigenpräsentation ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

5.5.2 Die effiziente Präsentation von NucNeoR auf MHC-II wird nicht durch Lysine in der NLS vermittelt

Um zu testen, ob die in der NLS enthaltenen Lysine, welche potentielle Ubiquitinylierungsstellen darstellen, für die gute Präsentation von NucNeoR und Nuc-mutNeoR verantwortlich waren, wurden weitere NeoR-Varianten erstellt. Dazu wurden neun Abfolgen an Lysinen und Asparaginen bzw. Alaninen (KAKN-NeoR) und als Kontrolle, neun Abfolgen von Argininen und Asparaginen bzw. Alaninen (RARN-NeoR), C-terminal an NeoR angefügt. KAKN-NeoR und RARN-NeoR wurden genauso effizient wie NucNeoR und Nuc-mutNeoR auf MHC-Klasse-II präsentiert. Die effiziente

Präsentation von NucNeoR war somit nicht auf das Vorhandensein mehrerer Lysine in der NLS zurückzuführen (Abbildung 5.31).

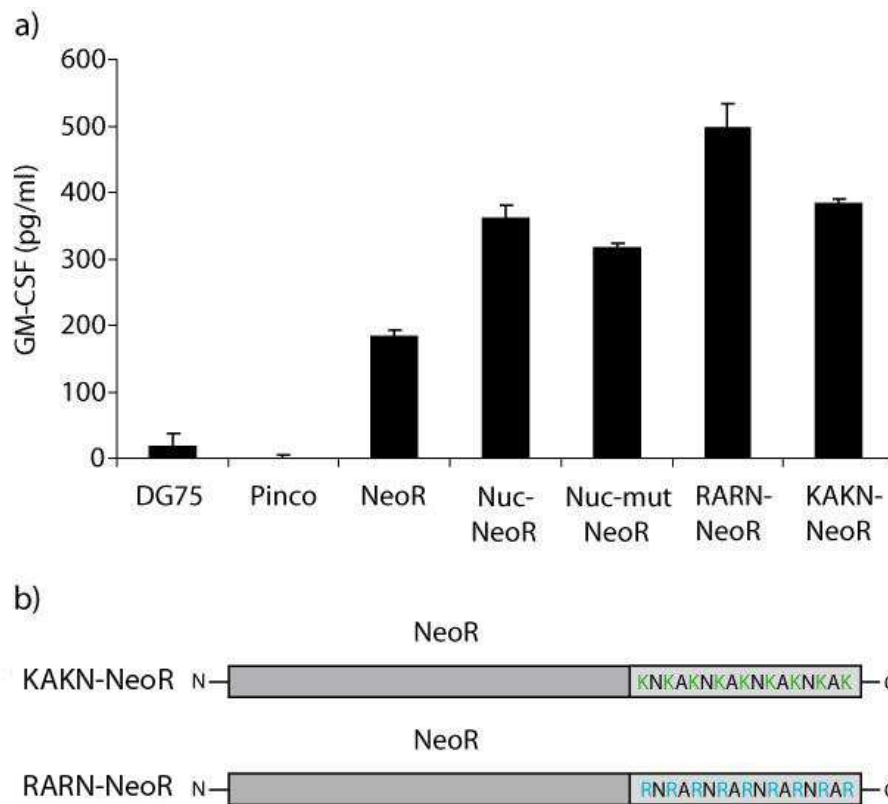


Abbildung 5.31: Die NeoR-Variante, an die eine Abfolge von Argininen oder von Lysinen angehängt wurde, wird ebenso effizient wie die nukleäre Variante von NeoR auf MHC-Klasse-II präsentiert

a) DG75 wurden mit Expressionsplasmiden für HLA-DPB1*0301 und jeweils einer der verschiedenen NeoR-Varianten bzw. dem Leervektor Pinco kotransfiziert. Neben NeoR und der nukleären Variante NucNeoR wurden auch die Konstrukte verwendet, in denen die NLS mutiert vorlag (Nuc-mutNeoR) oder durch eine Abfolge von neun Argininen (RARN-NeoR) bzw. Lysinen (KAKN-NeoR), getrennt durch jeweils ein Alanin (A) bzw. Asparagin (N), ersetzt worden war. 48 h nach Transfektion wurde der NeoR-spezifische CD4+ T-Zellklon 20-4/A4 zugegeben und die Zellen zusammen für weitere 20 h kokultiviert. Anschließend wurde der GM-CSF-Gehalt im Kulturüberstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatansätzen \pm Standardabweichung. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse. **b)** Schematische Darstellung des KAKN-NeoR bzw. RARN-NeoR-Konstrukts.

Parallel zur T-Zellerkennung wurde die Expression der verschiedenen NeoR-Varianten mittels Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 5.32). Alle NeoR-Formen zeigten nach einer 24-stündigen Behandlung mit 3-MA (7,5mM) eine Proteinanreicherung, was darauf hindeutete, dass alle Varianten Autophagiesubstrate sind.

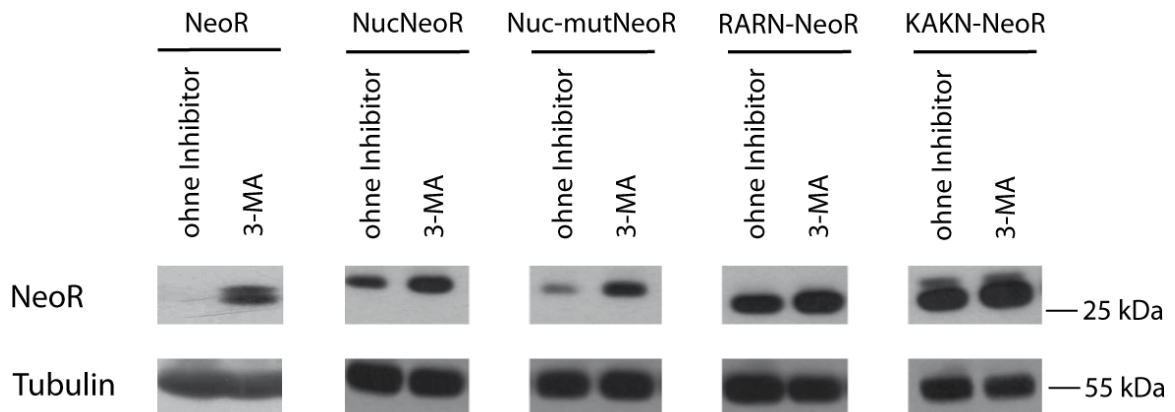


Abbildung 5.32: Nachweis der verschiedenen NeoR-Varianten mittels Western Blot

DG75-Zellen wurden mit den verschiedenen NeoR-Varianten transfiziert und die Hälfte der Zellen nach 24 h mit dem PI3K-Inhibitor 3-MA (7,5 mM) versetzt. Nach 48 h wurden Zelllysate hergestellt und Myc-NeoR im Western-Blot nachgewiesen.

5.5.3 Die Mutation ubiquitinylierbarer Aminosäuren im viralen BZLF1-Protein führt nicht zu einer verminderten Präsentation auf MHC-Klasse-II

Während früher angenommen wurde, dass Ubiquitinylierung ausschließlich an Lysinen oder Cysteinen erfolgen kann, weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass auch Serine und Threonine ubiquitinyliert werden können (Wang et al., 2007). Um die Rolle der Ubiquitinylierung in der Antigenprozessierung näher zu untersuchen, wurde auf Mutanten des EBV-Proteins BZLF1 zurückgegriffen, die von Herrn Benjamin Fiebiger in der Arbeitsgruppe zur Untersuchung des proteasomalen Abbaus von BZLF1 hergestellt worden waren. Dabei wurden entweder alle Lysine (K1-9), alle Cysteine (C1-5), alle Serine (S1-15), alle Threonine (T1-12) oder alle Lysine und Cysteine (KC) zu Arginin (im Falle von Lysinen) oder zu Alanin (im Falle von Cystein, Serin oder Threonin) mutiert. In Abbildung 5.33 c ist eine schematische Übersicht aller ubiquitinylierbarer Aminosäuren im BZLF1-Protein dargestellt. Um die Auswirkungen der Mutationen auf die Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II zu untersuchen, wurde das EBNA3C-Epitop (SDD), welches von dem CD4⁺ EBNA3C-spezifischen T-Zellklon SLE3C erkannt wird, an die verschiedenen BZLF1-Mutanten C-terminal angefügt. Expressionsplasmide dieser verschiedenen BZLF1-SDD-Konstrukte wurden in Raji-Zellen transient transfiziert und die Präsentation des SDD-Epitops auf MHC-Klasse-II durch die Koinkubation mit dem T-Zellklon SLE3C untersucht. Alle BZLF1-Varianten wurden von den T-Zellen auf gleichem Niveau erkannt (Abbildung 5.33 a), was die Vermutung nahe legte, dass nicht die Ubiquitinylierung einer

Aminosäureart für die Prozessierung notwendig ist, sondern alle als gleichwertige Ubiquitin-Andockstellen fungieren können. Um dies zu überprüfen, wurde das EBNA3C-SDD-Epitop an weitere BZLF1-Mutanten fusioniert, in denen verschiedene Kombinationen an Lysinen, Cysteinen, Serinen und Threoninen zu Arginin bzw. Alanin mutiert worden waren, und transient in Raji-Zellen transfiziert. Auch die Kombination aus verschiedenen zu Arginin bzw. Alanin mutierten ubiquitinylierbaren Aminosäuren führte nicht zu einer Verringerung der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II (Abbildung 5.33 b). Eine Übersicht der verschiedenen Mutanten ist in Abbildung 5.33 c) dargestellt.

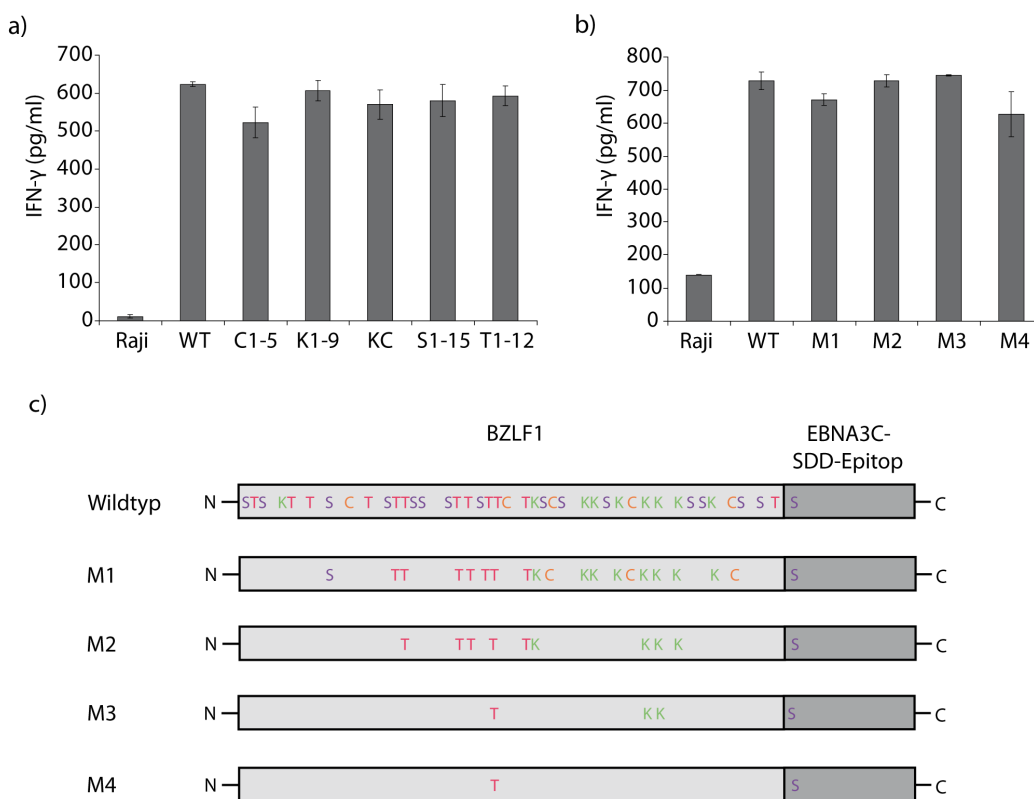


Abbildung 5.33: Die Mutation von ubiquitinylierbaren Aminosäuren in BZLF1 vermindert nicht die Präsentation des EBNA3C-Epitops auf MHC-II

a) Raji-Zellen wurden mit verschiedenen BZLF1-Expressionskonstrukten transfiziert, die alle C-terminal das von den CD4⁺ T-Zellen SLE3C erkannte SDD-Epitop trugen und in denen entweder alle Lysine zu Arginin (K1-9), bzw. alle Cysteine (C1-5), Serine (S1-15) oder Threonine (T1-12) zu Alanin, oder alle Lysine zu Arginin und Cysteine zu Alanin (KC) mutiert worden waren. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit den SLE3C T-Zellen kokultiviert und die IFN-γ-Sekretion im ELISA gemessen. **b)** In analoger Weise wurden BZLF1-Expressionskonstrukte in Raji-Zellen getestet, in denen diese vier Aminosäuren, wie in **c)** schematisch dargestellt, sukzessiv mutiert worden waren. In der Mutante M4 waren insgesamt nur noch zwei potentiell ubiquitinylierbare Aminosäuren innerhalb des Proteins vorhanden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatsansätzen +/- Standardabweichung. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

5.5.4 Für die endogene Präsentation auf MHC-II sind keine ubiquitinylierbaren Aminosäuren im Antigen notwendig

Um zu testen, ob eine ubiquitinylierungsabhängige Antigenpräsentation durch die zwei noch vorhandenen, potentiell ubiquitinylierbaren Aminosäuren in der BZLF1-Mutante M4 (Abbildung 5.34 b und c) erfolgte, wurde eine BZLF1-Vollmutante (VM) generiert, in welcher auch das noch vorhandene Threonin gegen Alanin ausgetauscht wurde und in der im EBNA3C-Epitop das Serin entfernt wurde. Nach C-terminaler Fusion an das Wildtyp-BZLF1-Protein und der Expression in Raji-Zellen wurde das so verkürzte, als DDE bezeichnete Epitop, von den SLE3C T-Zellen genauso effizient erkannt wie das SDD-Epitop (Abbildung 5.34 a). Als nächstes wurde das EBNA3C-DDE-Epitop an die BZLF1-Vollmutante (VM) fusioniert. Zudem wurde anschließend an das MHC-II-Epitop DDE das MHC-I-Epitop YVL, welches von der CD8⁺ T-Zelllinie Rp5 im Kontext von HLA-A2 erkannt wird, angefügt (Abbildung 5.34 b). Auch das acht Aminosäuren umfassende YVL Epitop enthält keine weiteren ubiquitinylierbaren Aminosäuren. Nach Kotransfektion dieser Konstrukte in HLA-A2-positive DG75-Zellen zusammen mit einem HLA-DQB1*0501-Expressionsplasmid wurden die Zellen parallel mit dem DDE-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon SLE3C sowie der YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinie Rp5 koinkubiert und die IFN- γ -Sekretion durch die T-Zellen im ELISA gemessen. Der Ansatz mit der CD8⁺ T-Zelllinie Rp5 diente als Transfektionskontrolle (Abbildung 5.34 d). Um Sättigungseffekte als Grund für fehlende Unterschiede in der Antigenpräsentation auszuschließen, wurden verschiedene Plasmidmengen transfiziert. Wie in Abbildung 5.34 c dargestellt, wurde das EBNA3C-Epitop DDE fusioniert an die BZLF1-Vollmutante (VM) nicht weniger effizient auf MHC-Klasse-II präsentiert, als fusioniert an das BZLF1-Wildtypprotein (WT).

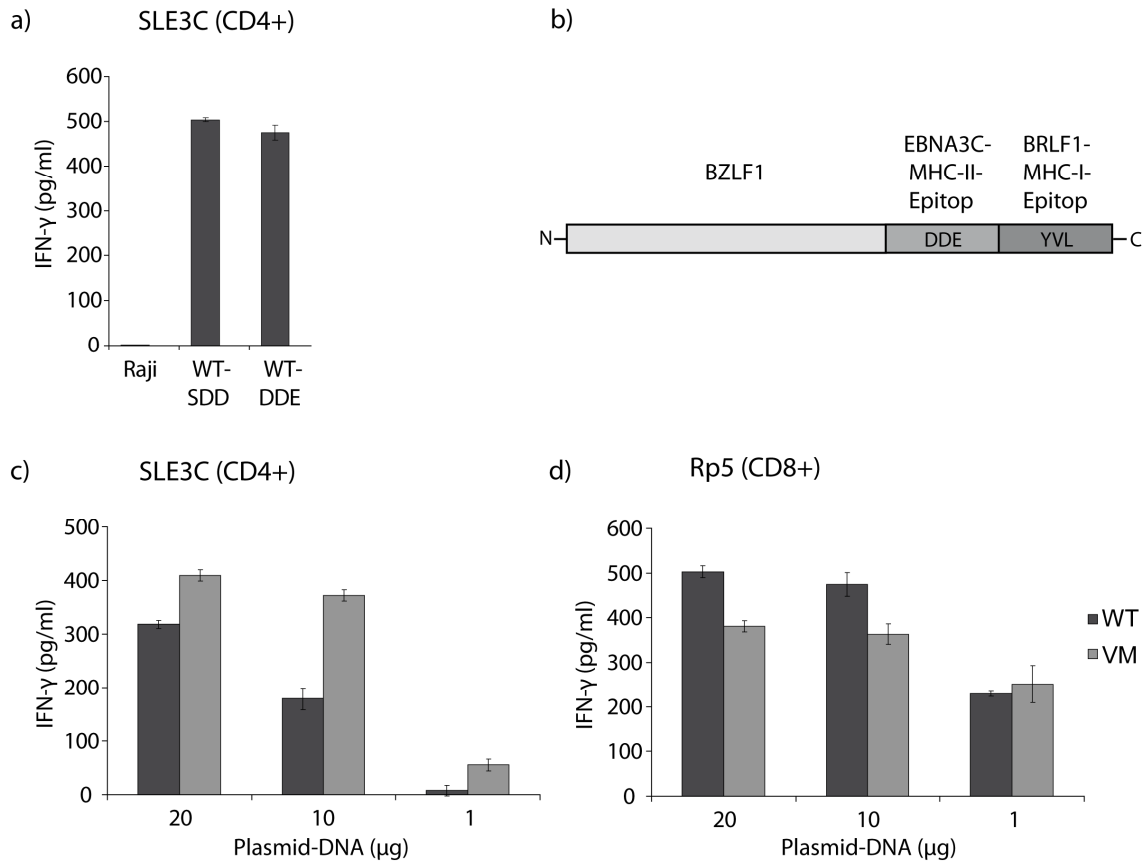


Abbildung 5.34: Die Mutation sämtlicher ubiquitinyliebarer Aminosäuren im BZLF1-Protein beeinträchtigt nicht die endogene Präsentation auf MHC-II

a) Raji-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Wildtyp-BZLF1, an welches C-terminal das EBNA3C-SDD-Epitop bzw. das verkürzte Epitop DDE fusioniert worden war, transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit dem EBNA3C-spezifischen T-Zellklon SLE3C kokultiviert. Nach weiteren 20 h wurde die IFN-γ-Sekretion durch die T-Zellen mittels ELISA gemessen. **b)** Schematische Darstellung des Fusionsproteins BZLF1-DDE-YVL. An den offenen Leserahmen von BZLF1 wurde das DDE-Epitop, welches von dem CD4+ EBNA3C-spezifischen T-Zellklon SLE3C im Kontext von HLA-DQB1*0501 erkannt wird, und das YVL-Epitop, welches von der CD8+ BRLF1-spezifischen T-Zelllinie Rp5 im Kontext von HLA-A2 erkannt wird, C-terminal angefügt. **c)** und **d)** DG75-Zellen wurden kotransfiziert mit einem Expressionsplasmid für HLA-DQB1*0501 und jeweils 20, 10 oder 1 μg eines Expressionsplasmids für Wildtyp-BZLF1-DDE-YVL (WT), oder der BZLF1-DDE-YVL Vollmutante (VM), in der alle ubiquitinyliebaren Aminosäuren innerhalb des Proteins gegen Arginin oder Alanin ausgetauscht worden waren. Nach 24 h wurden die Zellen parallel mit dem CD4+ EBNA3C-DDE-spezifischen T-Zellklon SLE3C (**c**) oder der CD8+ BRLF1-YVL-spezifischen T-Zelllinie Rp5 (**d**) kokultiviert. Nach weiteren 20 h wurde die IFN-γ-Sekretion durch die T-Zellen im ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatansätzen +/- Standardabweichung. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

5.5.5 Die Entfernung ubiquitinylierbarer Aminosäuren im zellulären Protein MART1 vermindert die endogene Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II nicht

Um auch die Rolle der Ubiquitinylierung bei der Prozessierung eines zellulären Proteins für die Präsentation auf MHC-II zu untersuchen, wurden analoge Versuche mit MART1 durchgeführt. MART1-Mutanten, in denen verschiedene Kombinationen an Lysinen, Cysteinen, Serinen und Threoninen zu Arginin bzw. Alanin mutiert worden waren, waren ebenfalls von Herrn Fiebiger in der Arbeitsgruppe hergestellt worden und wurden für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt. An diese verschiedenen Mutanten wurden C-terminal das EBNA3C-SDD- bzw. das DDE-Epitop angefügt (Abbildung 5.35). Anschließend an das MHC-II-Epitop DDE wurde das MHC-I-Epitop YVL, welches von der CD8⁺ T-Zelllinie Rp5 im Kontext von HLA-A2 erkannt wird, angefügt (Abbildung 5.35 d), um als Kontrolle zusätzlich die Präsentation auf MHC-Klasse-I untersuchen zu können. Die SDD-Konstrukte wurden in Raji-Zellen, die DDE-YVL-Konstrukte in DG75 zusammen mit dem HLA-DQB1*0501-Expressionsplasmid transfiziert und die Zellen 24 h später mit dem EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon SLE3C bzw. der CD8⁺ BRLF1-spezifischen T-Zelllinie Rp5 kokultiviert. Genau wie im Falle des viralen BZLF1-Proteins führte auch die Mutation verschiedener bzw. aller ubiquitinylierbarer Aminosäuren im zellulären MART1-Protein nicht zu einer geringeren Antigenpräsentation des EBNA3C-SDD-Epitops auf MHC-Klasse-II.

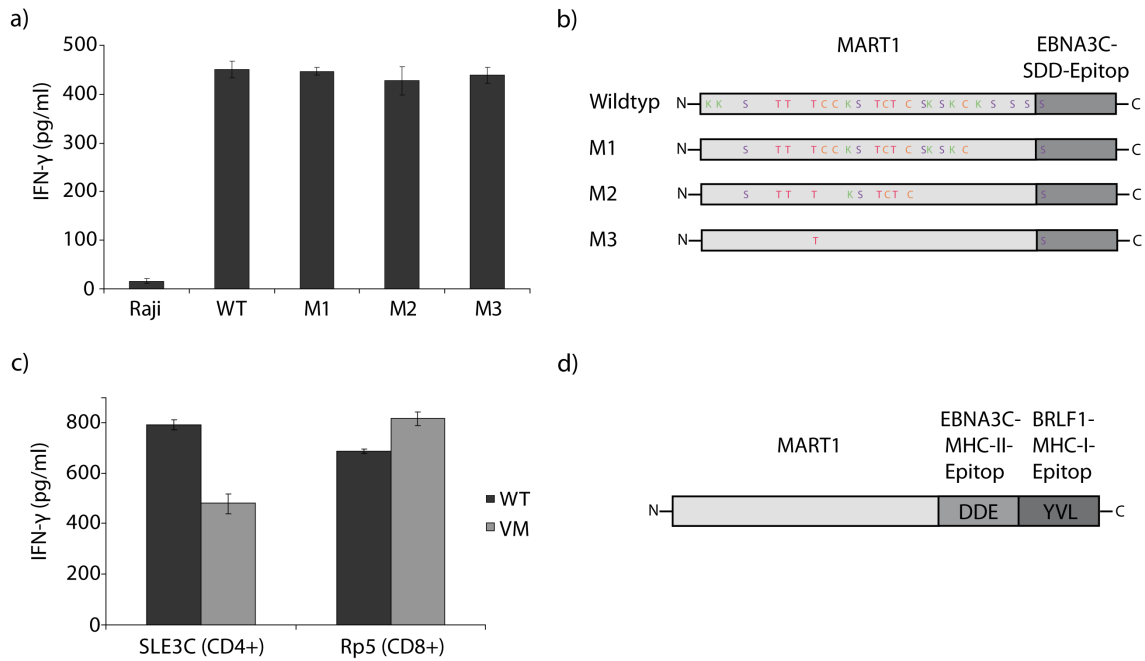


Abbildung 5.35: Die Mutation sämtlicher ubiquitinyliebarer Aminosäuren im MART1-Protein beeinträchtigt nicht die endogene Präsentation auf MHC-II

a) Raji-Zellen wurden mit verschiedenen, EBNA3C-SDD-Epitop-tragenden MART1-Expressionsplasmiden transfiziert. Neben Wildtyp MART1 wurden auch MART1-Mutanten verwendet, in denen verschiedene Kombinationen an Lysinen zu Arginin und Serinen, Threoninen und Cysteinen zu Alanin mutiert worden waren. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen mit dem EBNA3C-SDD-spezifischen T-Zellklon SLE3C für weitere 20 h kokultiviert. Anschließend wurde die sekretierte Menge an IFN-γ im ELISA gemessen. **b)** Übersicht über ubiquitinyliebare Aminosäuren im MART1-Wildtypprotein bzw. in den verschiedenen in a) aufgeführten MART1-Mutanten. **c)** DG75-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für Wildtyp-MART1-DDE-YVL (WT) bzw. für die MART1-DDE-YVL-Vollmutante (VM), in der alle ubiquitinyliebaren Aminosäuren zu Arginin oder Alanin mutiert worden waren, mit einem Expressionsplasmid für HLA-DQB1*0501 kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem CD4+ EBNA3C-DDE-spezifischen T-Zellklon SLE3C bzw. mit der CD8+ BRLF1-YVL-spezifischen T-Zelllinie Rp5 kokultiviert. 20 h später wurde die IFN-γ-Sekretion durch die T-Zellen im ELISA gemessen. **d)** Schematische Darstellung des MART1-Proteins, an welches das MHC-Klasse-II-Epitop DDE und das MHC-Klasse-I-Epitop YVL angefügt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikatanalysen +/- Standardabweichung. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ubiquitinyliebung von Aminosäuren innerhalb des Antigens selbst nicht für die Ub-K63-abhängige Präsentation über Autophagie verantwortlich sein kann.

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines konditionalen Testsystems zur zeitlich getrennten Expression eines Modellantigens und der Modulation von Autophagie

Die Charakterisierung der endogenen Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II erfolgte bislang mit Hilfe chemischer Inhibitoren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die experimentellen Grundlagen für die nähere Charakterisierung dieses Präsentationsweges auf genetischer Ebene geschaffen werden. Da in vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe die gleichzeitige Expression von shRNA gegen Beclin-1 und eines Modellantigens zu keiner Reduktion in der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II geführt hatte, wurde ein konditionales Expressionssystem etabliert, das eine zeitlich getrennte Expression von modulierenden shRNAs/Genen und Modellantigenen ermöglichte (Abbildung 5.1).

6.2 Der *knock-down* von Beclin-1 hat keinen Einfluss auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-II

Beclin-1, welches für die Induktion der Autophagosomenbildung notwendig ist, ist auch ein haploinsuffizienter Tumorsuppressor (Yue et al., 2003, Aita et al., 1999, Liang et al., 1999). 40% aller Prostatakarzinome, 50% der Mammakarzinome und 75% der Ovarialkarzinome (Sun and Peng, 2008) zeigen eine monoallelische Deletion von Beclin-1. Auch wurde eine verminderte Beclin-1-Expression in anderen Krebsarten, wie Kolonkarzinom, Hirntumoren oder Hepatozelluläres Karzinom, gefunden (Koneri et al., 2007, Miracco et al., 2007, Daniel et al., 2007). Überdies hinaus entwickeln Mäuse mit nur einem Beclin-1-Allel spontan Tumoren. Der vollständige Verlust von Beclin-1 ist hingegen vermutlich nicht mit dem Überleben der Zelle vereinbar. So sterben Beclin-1^{-/-} *knock-out* Mäuse an Tag 7,5 der Embryonalentwicklung (Yue et al., 2003). Worauf die tumorsuppressive Eigenschaft von Beclin-1 beruht, ist noch nicht endgültig geklärt. Als wahrscheinlich gilt die zentrale Rolle in der Induktion von Autophagie. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise darauf, dass Beclin-1 an der Regulation der Angiogenese beteiligt ist und somit Auswirkungen auf die Tumorentstehung und das Tumorstadium hat. Denkbar wäre aber auch, dass eine niedrigere Autophagierate oder Defekte im Autophagieprozess durch reduzierte Beclin-1-Spiegel in der Zelle zu

einer verminderten Präsentation von Tumorantigenen auf MHC-Klasse-II führen könnten, wodurch die Zellen einer ausreichenden CD4⁺ T-zellvermittelten Immunantwort entgehen würden. Um Hinweise auf eine Rolle von Beclin-1 bei der endogenen Autophagie-vermittelten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Präsentation endogener Antigene nach Expression Beclin-1-spezifischer shRNA analysiert. Der *knock-down* von Beclin-1 hatte keinen Einfluss auf die endogene Präsentation von EBNA3C oder BRLF1 auf MHC-Klasse-II. Zudem wurde durch 3-Methyladenin eine Reduktion der Antigenpräsentation auch in shBeclin-1-exprimierenden Zellen beobachtet (Abbildungen 5.8 und 5.9). Somit scheint für die Antigenpräsentation eine 3-MA-abhängige, aber Beclin-1-unabhängige Form von Autophagie verantwortlich zu sein. Eine Beclin-1-unabhängige Regulation der Autophagie wurde kürzlich beschrieben (Scarlatti et al., 2008, Tian et al., 2010). Alternativ könnten die nach Expression von spezifischen shRNA noch verbliebenen Beclin-1-Proteinmengen immer noch ausreichend sein für die Autophagie-abhängige Präsentation der Modellantigene.

Gegen eine wichtige Rolle von Beclin-1 in der Antigenpräsentation sprechen auch zusätzlich durchgeführte Versuche, in denen Bcl-2, BALF1 oder BHRF1 als potentielle Autophagiemodulatoren exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Von Bcl-2 ist bekannt, dass es an Beclin-1 bindet und darüber Autophagie inhibiert (Pattingre et al., 2005). BALF1 und BHRF1 sind virale Bcl-2-Homologe des EBV, von denen allerdings nicht bekannt ist, ob sie auch an Beclin-1 binden und den makroautophagischen Prozess beeinflussen (Taylor et al., 2011). Beide viralen Bcl-2-Homologe werden kurz nach Infektion primärer B-Zellen exprimiert (Altmann and Hammerschmidt, 2005), wobei die Expression von BHRF1 auch in der latenten Phase der Infektion nachgewiesen wurde (Kelly et al., 2009). Keines dieser Proteine beeinflusste die Präsentation von Modellantigenen auf MHC-II. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Beclin-1 eine untergeordnete Rolle bei der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation spielt, oder sehr geringe Mengen an Beclin-1 für die Autophagie-abhängige Antigenpräsentation ausreichen.

Dagegen weisen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen auf eine wichtige Rolle von Beclin-1 in der Antigenpräsentation hin. In Makrophagen, die mit dem Erreger *Mycobacterium tuberculosis* infiziert waren, wurde die Präsentation des mykobakteriellen Antigens 85B durch Rapamycin verstärkt. Dieser Effekt war aber nach Behandlung mit 3-MA oder durch die Expression einer Beclin-1-spezifischen siRNA aufgehoben (Jagannath et al., 2009). Außerdem wurde in einer weiteren Arbeit gezeigt, dass das HSV-1-Protein ICP34.5 über seine Beclin-1-bindende Domäne

(BBD) mit Beclin-1 interagiert und dadurch Autophagie in den infizierten Zellen hemmt. Nach Infektion mit einer BBD-defizienten Mutante ($\Delta 68\text{HR}$) wurde eine stärkere HSV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in Mäusen beobachtet, was auf eine wichtige Funktion von Autophagie und dem Autophagie-assoziierten Protein Beclin-1 bei der Antigenpräsentation von viralen Antigenen auf MHC-Klasse-II hindeutet. Die Expression der $\Delta 68\text{HR-ICP34.5}$ -Mutante beeinflusste die Virusreplikation hierbei nicht (Leib et al., 2009). Von anderen Herpesviren, wie z.B. EBV oder KSHV, wurde beschrieben, dass sie den makroautophagischen Prozess je nach Lebenszyklusphase verstärken oder inhibieren (Taylor et al., 2011). Auch manche RNA-Viren, welche zelluläre zytoplasmatische Komponenten als Gerüst für die RNA-Synthese benötigen, nutzen Makroautophagie für ihre Replikation und können ihrerseits Autophagie verstärken. Ein Beispiel hierfür ist das Influenza A Virus, welches nach Infektion Autophagie und auch den autophagischen Flux in infizierten Zellen verstärkt. Durch die Inhibierung von Autophagie durch z.B. 3-MA kommt es zu einem verringerten Virus-Titer (Zhou et al., 2009). Ob bzw. in welchem Ausmaß und über welche Signalwege diese Viren auch die Autophagie-abhängige Antigenpräsentation modulieren, ist bislang nicht bekannt. Während die eigenen Ergebnisse gegen eine Beteiligung von Beclin-1 und somit viraler, mit Beclin-1 interagierender Proteine in diesem Präsentationweg sprechen, weisen die Versuche zur Präsentation des mykobakteriellen Antigens 85B auf eine Beteiligung von Beclin-1 hin. Allerdings wurde in diesen Experimenten der Effekt des *knock-down* von Beclin-1 auf die Antigenpräsentation lediglich in Rapamycin-behandelten und nicht in unbehandelten Zellen untersucht (Jagannath et al., 2009). Zudem wurde der Einfluss auf die Antigenpräsentation im Kontext einer Infektion analysiert. Inwiefern sich der *knock-down* von Beclin-1 auch auf den Infektionsprozess oder die Aufnahme der Bakterien in Autophagosomen und somit indirekt auf die Antigenpräsentation auswirkte, ist nicht bekannt. Darüber hinaus handelt es sich bei dem untersuchten, mykobakteriellen Antigen um ein von den Bakterien synthetisiertes und an die Zelle abgegebenes Protein, während in den eigenen Untersuchungen die Präsentation von Antigenen getestet wurde, deren Synthese an zellulären Ribosomen erfolgte. Dies ist insofern von Bedeutung, als neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe auf eine präferentielle Aufnahme neu synthetisierter und nicht maturer Proteine in den endogenen Antigenpräsentationsweg hinweisen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Antigene auf unterschiedlichen Routen in das vesikuläre System gelangten.

6.3 Die Expression von Atg5 bzw. dnAtg5 hat keinen Einfluss auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-II

Auch zeigte weder die Überexpression von Wildtyp-Atg5 noch der dominant-negativen Variante von Atg5 (dnAtg5), die durch die Mutation des Lysins an Position 130 zu Arginin (K130R) nicht mehr an Atg12 binden kann (Dreux et al., 2009), einen Effekt auf die Antigenpräsentation von EBNA3C auf MHC-II (Abbildung 5.10). Dies war überraschend, denn von dnAtg5 ist beschrieben, dass es die Autophagosomenbildung unterdrücken kann. Dies wurde hauptsächlich in Kardiomyozyten aus Ratten gezeigt; zum einen durch die Expression der K130R-Atg5-Mutante (dnAtg5) (Hamacher-Brady et al., 2006) und zum anderen durch die Behandlung von Zellen mit dem Tat-Atg5-K130R Protein, das mit Hilfe der Transduktionsdomäne des Tat-Proteins von HIV die Zellmembran penetrieren kann (Becker-Hapak et al., 2001). Zudem wurde in HeLa-Zellen gezeigt, dass die Überexpression der Atg5-K130R-Mutante die Ausbildung LC3-GFP-positiver, punktförmiger Strukturen hemmt und autophagischen Zelltod inhibiert (Pyo et al., 2005). Allerdings wurden diese Effekte nicht in unbehandelten Zellen, sondern erst nach Induktion von Autophagie durch verschiedene Agenzien beobachtet. In den eigenen Untersuchungen verhielten sich beide Varianten identisch, sowohl bezüglich der verminderten Stabilisierung von NeoR-GFP als auch im Rahmen der Antigenpräsentation (Abbildungen 5.10 und 5.11). Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen könnten die Effekte von dnAtg5 und Atg5 zelltypabhängig sein. Zum anderen könnte die Überexpression dieser beiden Proteine auch toxisch auf die Zellen wirken, was neben der Verstärkung von Autophagie auch ein Grund für die Abnahme an NeoR-GFP nach Koexpression dieser Moleküle sein könnte. Auch kann die Beobachtung, dass die Expression des Atg5-WT-Proteins keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation zeigte, damit erklärt werden, dass die Atg12-Proteinmengen in den Zellen limitierend waren und somit nicht mehr Atg5-Atg12-Komplexe, die für die Autophagosomenbildung notwendig sind, entstehen konnten. Bei dem Nachweis von Atg5 bzw. dnAtg5 in Raji-Tet-Atg5/dnAtg5-Ery-EBNA3C-Zellen im Western Blot sah man einen Anstieg des freien Atg5-Proteins, nicht jedoch oder nur in sehr geringem Maße des Atg5-Atg12-Komplexes, was diese Vermutung unterstützt (Abbildung 5.10). Dafür sprechen auch die Ergebnisse früherer Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, in denen der *knock-down* von Atg12 durch siRNA eine Verminderung der Antigenpräsentation bewirkte (Riedel et al. 2008). Die Möglichkeit, dass Atg12 in dem Atg5-Atg12-Komplex der limitierende Faktor ist, kann in Zukunft durch gleichzeitige Modulation der Atg5- und Atg12-Proteinspiegel in

Antigenpräsentationsversuchen überprüft werden. Allerdings sollen hierbei sh- oder siRNAs gegen Atg5 zum Einsatz kommen, da hierdurch ein *knock-down* des Atg5-Proteins erreicht wird, während der Effekt der dominant negativen Atg5-Mutante nicht vollständig geklärt und nachgewiesen ist.

Auch könnte in den untersuchten Zellen bereits eine maximale Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem exprimierten Modellantigen vorgelegen haben, die durch die Überexpression von Atg5 nicht mehr gesteigert werden konnte. Diese Möglichkeit von Sättigungseffekten sollte allerdings in den Versuchen durch die Titration der Induktion des Antigens und der modulierenden Proteine vermieden werden. Auch könnten die ausgebliebenen Effekte von Atg5 oder dnAtg5 auf die Antigenpräsentation durch einen alternativen Autophagieprozesses, der unabhängig von Atg5, Atg7 und der Lipidierung von LC3 erfolgt, erklärt werden. Solch ein alternativer Signalweg wurde kürzlich beschrieben und ist abhängig von dem Protein Rab9, welches beim Transport von späten Endosomen zum *trans*-Golgi involviert ist. In Atg5^{-/-} MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) ist dieser alternative Autophagieprozess nicht durch Rapamycinbehandlung, aber durch Nährstoffmangel induzierbar (Nishida et al., 2009, Shimizu et al., 2010, Chua et al., 2011)

6.4 Die Inhibierung von mTORC1 oder mTORC2 führt nicht zu einer verstärkten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II

Um zu untersuchen ob die Autophagie-abhängige Antigenpräsentation durch die Serin/Threonin-Kinase mTOR reguliert wird, wurden in vorliegender Arbeit Antigenpräsentationsversuche mit den mTOR-Inhibitoren Rapamycin und dem Rapamycin-Derivat Everolimus durchgeführt. Diese beiden Substanzen inhibieren mTORC1 (Oudard et al., 2009). mTORC1 wird durch Rapamycin in einem Konzentrationsbereich von 0,5–100 nM gehemmt, wobei bereits Konzentrationen um 10 nM ausreichend sind um Autophagie zu induzieren (Jung et al., 2010, Martinet et al., 2007, Boland et al., 2008). Höhere Rapamycin-Konzentrationen von 0,2 – 20 µM inhibieren auch mTORC2, was zu einer Hemmung der Zellproliferation und zur Induktion von Apoptose führt (Foster and Toschi, 2009). In den eigenen Untersuchungen wirkte Rapamycin ab 100 nM und Everolimus bereits ab einer Konzentration von 10 nM inhibitorisch auf die Präsentation exogen zugesetzten Antigens, was auf unspezifische oder toxische Nebeneffekte der Substanzen schließen ließ (Abbildung 5.12). Die konzentrationsabhängige, verminderte Präsentation endogener Antigene in Anwesenheit dieser Inhibitoren beruhte somit vermutlich auf

ähnlichen Nebeneffekten dieser Substanzen. Ob dadurch mögliche verstärkende Effekte auf die Antigenpräsentation über die Induktion von Autophagie, welche in dieser Arbeit für Rapamycin gezeigt wurde, überdeckt wurden, bleibt ungeklärt.

Entgegen dieser Ergebnisse wurde allerdings in der bereits erwähnten Arbeit von Jagannath et al. gezeigt, dass durch die Behandlung mit Rapamycin die Prozessierung und Präsentation des Mycobakteriumantigens 85B in Makrophagen gesteigert wird. Neben den bereits oben beschriebenen Unterschieden in den experimentellen Ansätzen kamen hierbei auch Rapamycin-Konzentrationen von 10 μ M bis 1 mM zum Einsatz, welche weit über den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen lagen (Jagannath et al., 2009). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass die Präsentation eines Influenza A Hämagglutinin-Epitops fusioniert an die Neomycin-Phosphotransferase II auf MHC-Klasse-II durch die Behandlung mit 200 nM Rapamycin verstärkt wird (Comber et al., 2011). In beiden Arbeiten wurde allerdings keine Messung möglicher unspezifischer Effekte von Rapamycin vorgenommen. Somit bleibt ungeklärt, ob es nach Behandlung der Zellen mit diesen Konzentrationen an Rapamycin zu einem vermehrten Zelltod und in der Folge zu einer Freisetzung von Antigen aus infizierten Zellen und möglicherweise der Wiederaufnahme und Präsentation als exogenes Antigen über den klassischen MHC-II-Präsentationsweg durch Nachbarzellen kam.

In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass unter nährstoffarmen Bedingungen, welche zur Induktion von Autophagie in LCL führten, die Präsentation von Peptiden intrazellulärer Proteine gesteigert wurde, die Präsentation von Peptiden extrazellulärer Proteine oder von Membranproteinen jedoch nicht beeinflusst wurde (Dengjel et al., 2005). Da mTORC1 Signale wie Nährstoffmangel integriert und folglich Autophagie induziert, sprechen diese Ergebnisse für eine Beteiligung von mTORC1 bei der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation auf MHC-II.

Durch den Einsatz Raptor- bzw. Rictor-spezifischer shRNA sollte der mTORC1 bzw. der mTORC2 gehemmt werden und deren Beitrag bei der Regulation von Autophagie-abhängiger Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II untersucht werden. Jedoch konnte weder nach Vorinduktion der shRNA noch nach zeitgleicher Expression mit dem Modellantigen ein Einfluss auf die Antigenpräsentation detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was ebenfalls gegen eine Beteiligung von mTOR bei der Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-II spricht.

Ein limitierender Faktor bei all diesen Untersuchungen, in denen das konditionale Tet-Ery-System eingesetzt wurde, war, dass das Antigen nicht ohne die gleichzeitige

Expression des Modulators exprimiert werden konnte. Deshalb wurden zudem Plasmide generiert, in denen das Antigen unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Promotors und der Modulator unter der Kontrolle des Erythromycin-abhängigen Promotors exprimiert wurde. Dies schuf die Möglichkeit, das Antigen mit und ohne gleichzeitige Expression modulierender Gene/shRNAs zu exprimieren, wodurch eine geeignetere Kontrolle innerhalb einer Zelllinie zur Verfügung stand. Mit den so generierten Zelllinien konnte jedoch nach Behandlung mit Erythromycin und Doxzyklin versus Doxzyklin alleine ebenfalls kein Effekt auf die Antigenpräsentation detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Eine mögliche Erklärung für diese negativen Ergebnisse wäre zum einen ein ungenügender *knock-down* der Autophagie-regulierenden Gene. Womöglich waren die noch vorhandenen Proteinmengen ausreichend um ein basales und für die Antigenpräsentation ausreichendes Maß an Autophagie zu gewährleisten. Im Falle von mTOR kam es womöglich durch die Modulation dieses zentralen Regulators von Zellwachstum und Proliferation zu gegenläufigen und sich überdeckenden Effekten (z.B. Stimulation von Autophagie und Hemmung von Proteinsynthese). Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Gene keine Rolle in der Regulation der für die Antigenpräsentation verantwortlichen Autophagie spielen.

Aus diesen Gründen wurde das Augenmerk auf Prozesse unterhalb der Induktion der Autophagosomenbildung gelegt.

6.5 Der *knock-down* von p62 und die Expression der Ubiquitin-K63R-Mutante führen zu einer verringerten Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II

In vorliegender Arbeit wurde eine Beteiligung des Adaptorproteins p62 an der Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II nachgewiesen (Abbildungen 5.17 und 5.19). Da p62 zum einen an ubiquitinylierte Proteine und zum anderen an LC3 bindet, deutet dies auf eine selektive Aufnahme von Antigen in Autophagosomen hin. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die N-terminale Fusion von Antigen an LC3 zu einer verstärkten Präsentation des Antigens auf MHC-II führt (Schmid and Munz, 2008). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass hierfür das Glycin an Position 120 essentiell ist, welches für die Konversion von LC3-I zu LC3-II benötigt wird (Comber et al., 2011).

p62 bindet Mono- und Polyubiquitin, insbesondere K63-vernetztes (Long et al., 2008). So wird in p62-*knock-out*-Mäusen eine Anreicherung von K63-polyubiquitinmarkierten Proteinen beobachtet (Wooten et al., 2008). In vorliegender Arbeit konnte durch die Überexpression der Ub-K63R-Mutante eine Beteiligung von K63-Polyubiquitin bei der Autophagie-abhängigen, endogenen Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II nachgewiesen werden (Abbildungen 5.21, 5.23 und 5.26). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass K63-polyubiquitinylierte Antigene von p62 gebunden und über die Interaktion mit LC3 in Autophagosomen dirigiert werden. Für p62 wurde auch beschrieben, dass es Proteine auf bislang nicht näher charakterisiertem Weg zum Proteasom dirigiert und so ihren Abbau fördert (Babu et al., 2005, Wooten et al., 2006). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da der *knock-down* von p62 zu keiner verminderten Präsentation von Antigen auf MHC-I führte (Abbildung 5.19).

Neben p62 wurden bislang drei weitere Proteine mit Ubiquitin-bindenden sowie LC3 interagierenden Domänen beschrieben: NBR1, NDP52 und Optineurin. Ob bzw. inwieweit diese Proteine zur Antigenpräsentation beitragen, ist momentan noch unklar und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Da das Adaptorprotein NBR1 im Gegensatz zu p62 mit gleich hoher Affinität an K48- und K63-Polyubiquitin bindet (Kirkin et al., 2009), und in vorliegender Arbeit kein inhibitorischer Effekt der Ub-K48R-Mutante auf die MHC-Klasse-II-Präsentation beobachtet wurde (Abbildungen 5.21, 5.23 und 5.26), scheint zumindest NBR1 keine entscheidende Rolle in der Antigenpräsentation auf MHC-II zu spielen (Munz, 2012).

Um die Beteiligung von p62 bei der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation noch weiter zu bekräftigen, soll zukünftig eine *knock-down knock-in* Strategie angewandt werden. Da die p62-spezifische shRNA gegen einen Sequenzabschnitt in der 3' UTR gerichtet ist, soll mit Hilfe der konditionalen Vektoren zum *knock-down* von endogenem p62 auch die Reexpression einer p62 cDNA erfolgen. Hierzu wurden bereits Plasmide generiert, in denen die shRNA gegen p62 und ein Modellantigen unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen Promotors und p62 ohne seine UTRs unter der Kontrolle des Erythromycin-abhängigen Promotors exprimiert werden können. In transfizierten Zelllinien kann somit nach dem *knock-down* von endogenem p62 der Effekt der Reexpression von p62 untersucht werden. Diese Experimente sollen ausschließen, dass die shRNAs unspezifische *off-target* Effekte auslösen.

Neben seiner Funktion als Adaptorprotein kann p62 auch den mTOR-Signalweg stimulieren, indem es die Interaktion zwischen Raptor, der zentralen TORC1-

Komponente, und Rag GTPasen auf der Oberfläche von Lysosomen fördert. Durch die Degradation von p62 mittels Autophagie kommt es folglich zur Hemmung von mTOR (Neufeld, 2012, Duran et al., 2011), was zu einer Steigerung von Autophagie führen sollte. In vorliegender Arbeit konnte dies für die Autophagie-abhängige Antigenpräsentation nicht bestätigt werden, da, wie oben diskutiert, ein stark inhibitorischer Effekt auf die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II nach Expression von p62-spezifischer shRNA beobachtet wurde.

p62 scheint zudem auch während der angeborenen Immunantwort eine bedeutende Rolle zu spielen. Es dirigiert verschiedene zytosolische Proteine in Autophagosomen, die anschließend dort proteolytisch in antimikrobielle Peptide gespalten werden. Diese Peptide tragen unter anderem entscheidend zur Beseitigung von *M. tuberculosis* bei (Ponpuak et al., 2010). Außerdem werden Ubiquitin-umhüllte Bakterien selektiv über p62 in Autophagosomen geschleust (Zheng et al., 2009). Diese und die eigenen Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von p62 bei der angeborenen und auch der adaptiven Immunantwort hin.

Neben einer Beteiligung von K63-verkettetem Polyubiquitin bei der Degradation des Antigens wären zudem auch degradationsunabhängige, ubiquitinvermittelte Effekte auf die MHC-Klasse-II-Präsentation endogener Proteine denkbar. Hinsichtlich der MHC-Klasse-I-Präsentation wurde dies vor kurzem für das Hepatitis B Hüllprotein beschrieben. Ubiquitylierung innerhalb des Proteins hat hierbei einen verstärkenden Effekt auf die Antigenpräsentation, allerdings wird die Degradation über das Proteasom selbst nicht verstärkt (Liu et al., 2011). Dies lässt vermuten, dass womöglich auch für die MHC-II-Präsentation degradationsunabhängige ubiquitinvermittelte Effekte existieren.

6.6 Die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen wird durch die Überexpression der Ubiquitin-Mutanten nicht beeinflusst

In vorliegender Arbeit konnte durch die Überexpression der K48R-, K63R- oder K1-7-Ubiquitinmutanten keine Veränderung der MHC-Oberflächenexpression festgestellt werden. So führte die Transfektion von DG75-Zellen mit den verschiedenen Ubiquitin-Expressionskonstrukten zu keiner verminderten MHC-II-Expression und, nach Beladung der Zellen mit antigenem Peptid, zu keiner verminderten Erkennung durch Antigen-spezifische T-Zellen (Abbildung 5.27). Allerdings wurde bereits beschrieben,

dass die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen durch Ubiquitylierung reguliert wird (Jiang and Chen, 2012). Die E3-Ubiquitinligase MARCH1 ubiquityliert das Lysin an Position 225 des zytoplasmatischen Teils der MHC-II- β -Kette (Matsuki et al., 2007, Walseng et al., 2010). Während für andere membranständige Rezeptoren beschrieben wurde, dass eine K63-vernetzte Polyubiquitylierung die Internalisierung fördert (Slotman et al., 2012), bewirkt die Ubiquitylierung von MHC-II nicht eine vermehrte Endozytose, sondern dient wahrscheinlich als Sortierungssignal für die Einschleusung in den endolysosomalen Abbauweg (Matsuki et al., 2007). Wieso in den eigenen Untersuchungen die Hemmung der Polyubiquitylierung keine erhöhte MHC-II-Oberflächenexpression zur Folge hatte, ist momentan noch ungeklärt. Möglicherweise ist bereits eine Monoubiquitylierung der β -Kette für die Direktion ins endolysosomale Kompartiment ausreichend. Auch könnte eine Polyubiquitylierung erforderlich sein, welche aber über eine Vernetzung unterschiedlicher Lysine erfolgen kann. Dagegen spricht allerdings, dass die K48R-Ubiquitinmutante einen verstärkenden Effekt auf die endogene Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II zeigte (Abbildung 5.26 a) und die Expression der Ub-K1-7-Mutante keine Reduktion der MHC-II-Oberflächenexpression bewirkte. Nicht auszuschließen ist auch, dass die verwendeten experimentellen Nachweismethoden (FACS und T-Zellerkennung Peptid-beladener Zellen) nicht sensitiv genug waren, um nach transienter Expression der Ubiquitinmutanten eine Abnahme der MHC-II-Oberflächenexpression detektieren zu können. In weiterführenden Untersuchungen soll der Einfluss der verschiedenen Ubiquitinmutanten auf die Antigenpräsentation vergleichend in Zellen untersucht werden, in denen neben Antigen und den verschiedenen Ubiquitinmutanten auch die für das Antigen restringierende HLA-DR- β -Kette bzw. die entsprechende K225R-Mutante exprimiert wird.

6.7 Die Präsentation auf MHC-Klasse-II setzt keine Ubiquitylierung des Antigens voraus

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass NeoR effizienter über einen Autophagie-vermittelten Präsentationsweg auf MHC-II gelangt, wenn es durch das Anfügen eines nukleären Lokalisationssignals in den Zellkern dirigiert wird (NucNeoR) (Nimmerjahn et al., 2003; Riedel et al., 2008). Dieses Ergebnis war unerwartet und ist bislang unverstanden, da Autophagie im Zytoplasma aber nicht im Zellkern stattfindet. Auch konnte in Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Autophagie-abhängige Antigenpräsentation nukleärer Antigene

unabhängig von CRM1-vermittelten Kernexport stattfindet (Riedel et al., 2008) und auch nicht der Auflösung der Kernhülle während der Mitose bedarf (Riedel, 2007). Eine denkbare Erklärung wäre die direkte Aufnahme nukleärer Proteine in den Autophagie-assoziierten Präsentationsweg durch Kernmembran-abgeleitete, autophagosomen-artige Strukturen, wie sie in Maus-Makrophagen nach der Infektion mit HSV-1 beobachtet wurden (English et al., 2009). Angesichts der erhaltenen Ergebnisse zur Ubiquitinylierung der Antigene war auch vorstellbar, dass die 12 Lysine in der NLS von NucNeoR für die verbesserte Antigenpräsentation verantwortlich waren.

Deshalb wurde überprüft, ob die im Vergleich zu NeoR effizientere Präsentation von NucNeoR auf MHC-Klasse-II auf der nukleären Lokalisation des Proteins, oder der Anwesenheit mehrerer potentiell ubiquitinylierbarer Aminosäuren im Lokalisationssignal beruhte. Dazu wurde die angefügte SV40-NLS so mutiert, dass sie nicht mehr funktionell und NeoR wieder gleichmäßig in Zytoplasma und Zellkern lokalisiert war (Abbildung 5.29). Diese NeoR-Variante mit der mutierten NLS (Nuc-mutNeoR) wurde ebenso effizient auf MHC-II präsentiert wie NucNeoR (Abbildung 5.30). Dies deutete darauf hin, dass die subzelluläre Lokalisation von Proteinen für die Präsentation auf MHC-Klasse-II nicht entscheidend ist. Darüber hinaus ließ die, trotz gleicher subzellulärer Lokalisation, im Vergleich zu NeoR deutlich bessere Präsentation von Nuc-mutNeoR auf MHC-II auf eine Beteiligung der Lysine in der NLS an der Antigenpräsentation schließen. Um diese Annahme experimentell zu testen, wurden Abfolgen von jeweils neun Lysinen bzw. Argininen C-terminal an NeoR angefügt und die so entstandenen NeoR-Varianten in Antigenpräsentationsversuchen getestet. Überraschenderweise wurden beide Varianten ähnlich gut präsentiert wie NucNeoR und Nuc-mutNeoR, was gegen eine unmittelbare Beteiligung der Lysine der NLS an der Antigenpräsentation sprach (Abbildung 5.31). Auch kam es nicht zu einem vermehrten Abbau der KAKN-NeoR-Variante im Vergleich zur Kontrolle, was im Western Blot durch vergleichbare Proteinmengen nachgewiesen wurde (Abbildung 5.32). Die im Vergleich zu NeoR verbesserte Präsentation all dieser Antigenvarianten legte eher die Vermutung nahe, dass die C-terminale Modifikation die biochemischen Eigenschaften von NeoR veränderte. Die im Vergleich zu NeoR höheren Proteinspiegel der NeoR-Varianten im Western Blot könnten auf einen partiellen Schutz vor proteasomalem Abbau hinweisen. Insgesamt deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Erhöhung der Anzahl ubiquitinylierbarer Aminosäuren nicht direkt mit einer verbesserten Antigenpräsentation korreliert. Möglicherweise sind bereits wenige ubiquitinylierbare Aminosäuren ausreichend, oder nicht die Ubiquitinylierung

des Antigens, sondern anderer Komponenten des Antigenpräsentationsweges, ist ausschlaggebend.

Um die Rolle der Ubiquitylierung von Antigenen näher zu untersuchen, wurde die Präsentation von MHC-II-Epitopen fusioniert an Modellantigene (BZLF1, MART1) untersucht. Diese Modellantigene enthielten nur noch wenige oder gar keine ubiquitylierbaren Aminosäuren (C,K,S,T) mehr. Überraschenderweise wurden alle Antigenvarianten ähnlich effizient auf MHC-II präsentiert (Abbildung 5.33, 5.34 und 5.35). Dieses Ergebnis war unerwartet, da der *knock-down* von p62 und die Überexpression der K63R-Ubiquitinmutante und die daraus resultierende verminderte Antigenpräsentation von EBNA3C oder BRLF1 auf MHC-Klasse-II eine direkte Ubiquitylierung des Antigens nahegelegt hatten.

Eine mögliche Erklärung für die auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse könnte z.B. sein, dass p62 auch in der Lage ist an nicht ubiquitylierte Proteine zu binden und sie selektiv in den autophagischen Abbauprozess einzuschleusen, wobei die Bindung, nicht wie für ubiquitylierte Proteine beschrieben, über die UBA-Domäne, sondern über die PB1-Domäne (*Phox and Bem 1 domain*) von p62 erfolgt (Watanabe and Tanaka, 2011). Bei dieser Möglichkeit wäre jedoch zu klären, bei welchem Schritt der MHC-II-Präsentation K63-Polyubiquitin eine Rolle spielt und wie die Spezifität für eine Bindung an p62 erzielt wird. Die Substratspezifität könnte über die in einigen Proteinen enthaltene SH2-Domäne oder über indirekte Interaktionen vermittelt werden. Dies wäre z.B. durch die Interaktion von p62 mit dem Hsc-70-Hsp70 Cochaperon BAG3 möglich, welches ungefaltete Proteine in den makroautophagischen Prozess für die Qualitätskontrolle einschleust (Gamerding et al., 2009, Watanabe and Tanaka, 2011).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Präsentation von EBNA3C und BRLF1 auf MHC-Klasse-II eine Ubiquitylierung (K63R) des Proteins erfordert und p62-abhängig verläuft, die von BZLF1 und MART1 hingegen ubiquitinunabhängig stattfindet. Auch wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass alle BZLF1- und MART1-Mutanten und die jeweiligen Wildtypproteine ähnlich effizient auf MHC-Klasse-II präsentiert wurden, dass eine N-terminale Ubiquitylierung des BZLF1- bzw. MART1-Proteins stattfindet und diese ausreichend ist für eine effiziente MHC-II-Prozessierung. Allerdings wurde eine N-terminale Ubiquitylierung von Proteinen hauptsächlich im Zusammenhang mit proteasomalem Abbau berichtet, bei dem K63-verkettetes Ubiquitin nicht beteiligt ist (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004). Darüber hinaus ergaben erste massenspektroskopische Untersuchungen bislang keinen Hinweis auf eine N-terminale

Ubiquitinylierung, weder der Wildtyp noch der CKST-freien Modellantigene (Daten nicht gezeigt).

Von einem der in dieser Arbeit eingesetzten Modellantigene, MART1, ist eine K63-verkettete Polyubiquitinylierung beschrieben worden. MART1 ist ein integrales Membranprotein, welches bei der Melanosomenreifung in Melanozyten beteiligt ist. Es wird Ub-K63-abhängig vom Golgi-Kompartiment über multivesikuläre Körperchen (*multivesicular bodies*, MVB) zu den Melanosomen transportiert. K63-verkettete Ubiquitinylierung dient hierbei als Sortierungssignal. Bei Überexpression einer Ub-K63R-Mutante und des MART1-Proteins wurde in Hela-Zellen gezeigt, dass weniger MART1-Protein in intraluminale Vesikel (*intraluminal vesicles*, ILV) der MVB gelangte (Erpapazoglou et al., 2012). MART-1 wurde darüber hinaus auch in autophagosomenartigen Strukturen nachgewiesen (Truschel et al., 2009) und es wurde Autophagie von Melanosomen beobachtet (van den Boorn et al., 2011). Für die Ubiquitinylierung von MART1 sind die E3-Ligasen Nedd4 und ITCH verantwortlich. Sie markieren es somit für den Abbau in Lysosomen (Levy et al., 2005). Außer durch Autophagie könnte MART-1 auch auf diesem Weg in den MHC-II-Präsentationsweg gelangen. Umso erstaunlicher waren die eigenen Ergebnisse, die keine Verringerung der MHC-II-Präsentation von einem an die MART1-Vollmutante fusionierten MHC-II-Epitops zeigten. In Zukunft sind weitere Versuche geplant, in denen der Einfluss der Ub-K63R-Mutante auf die Präsentation des an die MART1-Vollmutante fusionierten MHC-II-Epitops getestet werden soll. Sollte hierbei die Ubiquitinmutante ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Antigenpräsentation haben, so wäre dies ein weiteres Indiz dafür, dass Ubiquitinylierung innerhalb des MART1-Proteins für die Antigenpräsentation keine Rolle spielt.

Um zu bestätigen, dass die Prozessierung der Antigene selbst unabhängig von einer Ubiquitinylierung erfolgt und womöglich andere Komponenten in den Präsentationswegen durch Ubiquitin reguliert werden, soll zudem der Einfluss der Ubiquitinmutanten auf die Präsentation von Antigenen untersucht werden, die nicht prozessiert werden müssen oder deren Prozessierung in Lysosomen erfolgt. Dazu sollen zum einen die von den T-Zellen erkannten Epitope (nicht die vollständigen Proteine) exprimiert werden, oder zum anderen die Antigene an Signalsequenzen fusioniert werden, wie die N-terminale Region der invarianten Kette, wodurch Proteine direkt ins MHC-II Kompartiment dirigiert werden. Erste Ergebnisse für die MHC-Klasse-I-Präsentation des BRLF1-Epitops YVL zeigten, dass die Ubiquitinmutanten Ub-K48R, Ub-K63R und Ub-K1-7 keinen Effekt auf dessen Präsentation haben (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine direkte Beteiligung der Ubiquitinylierung bei der

Proteinprozessierung/Degradation für die MHC-Klasse-I-Präsentation hin. Die MHC-II-Epitope DDE (EBNA3C) und APT (BRLF1) wurden in ersten Versuchen hingegen nicht oder nur in sehr geringem Maße, auch ohne Koexpression mit den Ubiquitinmutanten, präsentiert (Daten nicht gezeigt). Womöglich gelangen sehr kurze Peptide nur in geringem Maße oder gar nicht in den endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg.

6.8 Werden die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentationswege aus dem gleichen intrazellulären Antigenpool gespeist?

Durch die Koinkubation BRLF1-transfizierter DG75-Zellen zum einen mit CD4+ BRLF1-spezifischen und zum anderen mit CD8+ BRLF1-spezifischen T-Zellen, wurde in vorliegender Arbeit gezeigt, dass durch die Überexpression der K63R-Ubiquitinmutante die Präsentation auf MHC-Klasse-II abnimmt, die auf MHC-Klasse-I im Gegensatz dazu ansteigt. Einen genau entgegengesetzten Effekt zeigte die K48R-Ubiquitinmutante. Nach Koexpression mit dem Antigen BRLF1 wurde die Präsentation auf MHC-Klasse-I inhibiert, während sie auf MHC-Klasse-II anstieg (Abbildung 5.26).

Die gegenläufigen Effekte der Ub-K48R- und der Ub-K63R-Mutante auf die MHC-I- und MHC-II-Präsentation deuten darauf hin, dass ein gemeinsamer Antigenpool existiert, aus dem beide MHC-Präsentationswege gespeist werden. Folglich würden durch die Hemmung eines der beiden Präsentationswege die Substrate vermehrt in den jeweils anderen Präsentationsweg gelangen.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits durch F. Nimmerjahn Experimente durchgeführt, in denen er zeigen konnte, dass der Proteasominhibitor Lactacystin zu einer verstärkten endogenen Antigenpräsentation von NeoR auf MHC-Klasse-II führt. Allerdings standen zu diesem Zeitpunkt noch keine Paare an Antigen-spezifischen CD4+ und CD8+T-Zellen zur Verfügung, um die Präsentation eines Antigens sowohl auf MHC-I als auch auf MHC-II zu untersuchen. Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der BRLF1-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen erhaltenen Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung. Ließen sich diese Ergebnisse an weiteren Antigenen bestätigen, würde dies auf einen gemeinsamen Antigenpool hinweisen, aus dem die endogenen MHC-I und II-Präsentationswege gespeist werden.

Für diese Hypothese sprechen auch die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, wonach Proteasominhibitoren Autophagie verstärken und andersherum eine Autophagieblockade zu erhöhter proteasomaler Degradation führt (Munz, 2011, Zhu et

al., 2010). Autophagie stellt z.B. in Neuronen möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus bei gestörter UPS-Funktion dar. Dies scheint abhängig von der Microtubuli-assoziierten Histon Deacetylase 6 (HDAC6) und einem intakten Mikrotubuli-Cytoskelett zu sein. HDAC6 bindet an Ubiquitin und ist bei der Bildung von Aggresomen, großen Proteineinschlusskörperchen, welche sich durch Anhäufung von z.B. falsch gefalteten Proteinen bei gestörter UPS-Funktion bilden, beteiligt (Iwata et al., 2005, Pandey et al., 2007, Kawaguchi et al., 2003).

Auch wird für die Generierung von Peptiden für die Präsentation auf MHC-Klasse-I schon seit längerem postuliert, dass sogenannte DRiPs (*defective ribosomal products*) zum größten Teil zum Antigenpool beitragen (Reits et al., 2000, Yewdell and Nicchitta, 2006, Schubert et al., 2000). In neueren Arbeiten wurde zudem gezeigt, dass DRiPs nicht nur durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut werden können, sondern auch Autophagiesubstrate darstellen. Eine weitere interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass DRiPs, welche über Autophagie degradiert werden, zu UPS-Substraten werden, sobald Autophagie gehemmt wird und die so entstandenen Peptide auf MHC-Klasse-I präsentiert werden. (Wenger et al., 2012).

Durch die Koexpression von Ub-K48R bzw. von Ub-K63R kam es nicht zu einer Anreicherung von BRLF1- oder EBNA3C-Protein (Abbildungen 5.22, 5.25 und 5.26). In allen Transfektanten werden annähernd gleiche Proteinmengen detektiert, was dafür spricht, dass durch Inhibierung des einen Abbauweges das Protein durch den anderen degradiert wird und es zu keiner Anreicherung des Proteins kommt. Dieser Theorie widerspricht allerdings die Beobachtung, dass durch Behandlung von Zellen mit dem Autophagieinhibitor 3-Methyladenin Autophagiesubstrate angereichert werden (Abbildung 5.32) und durch die Behandlung mit Proteasominhibitoren Proteine ebenfalls stabilisiert werden konnten. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass solche Inhibitoren einen stärkeren Effekt haben als die überexprimierten Ubiquitinmutanten, wodurch die stabilisierten Substrate nicht vollständig durch den jeweils anderen Degradationsweg aufgefangen werden können. Die in dieser Arbeit überexprimierten Ubiquitinmutanten konkurrieren mit endogenem Wildtyp-Ubiquitin, was wahrscheinlich dazu führt, dass es zu keiner vollständigen Blockade des jeweiligen Degradationsweges kommt.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit deuten auf einen gemeinsamen Antigenpool für die endogene Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II hin. Um diese Hinweise noch weiter zu bekräftigen sollen in Zukunft Versuche

durchgeführt werden, in denen der Effekt von chemischen Autophagie- bzw. Proteasominhibitoren parallel auf die beiden Präsentationswege getestet werden soll.

6.9 Ausblick

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Abhängigkeit der endogenen, Autophagie-vermittelten Präsentation von Antigenen auf MHC-II von p62 deutet auf einen selektiven Import von Antigenen in Autophagosomen hin. Ob neben p62 weitere Adaptorproteine dabei eine Rolle spielen und wie die Erkennung/Bindung der Antigene erfolgt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Zudem weist die reziproke Verschiebung der Antigenpräsentation in Richtung MHC-I und MHC-II durch die Expression verschiedener Ubiquitinmutanten auf einen gemeinsamen Antigenpool hin, aus dem beide Präsentationswege gespeist werden. Sollten sich diese Ergebnisse an weiteren Antigenen und mit Hilfe chemischer Inhibitoren bestätigen, so würde dies auf einen Wettstreit der beiden Präsentationswege um die gleichen Substrate hinweisen. Folglich würden die auf MHC-II präsentierten Peptide ebenfalls von DRiPs (*defective ribosomal products*) abstammen. Darüber hinaus gilt es die Rolle der Ubiquitylierung in der Antigenpräsentation weiter aufzuklären. Da für die endogene Präsentation auf MHC-II keine Ubiquitylierung innerhalb des Antigens notwendig ist, müssen andere Komponenten des Präsentationswegs darüber reguliert werden. Diese zu identifizieren und herauszufinden, wie sie die Antigenpräsentation steuern, wäre ein entscheidender Schritt zum besseren Verständnis dieses Präsentationsweges.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Klassischer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Präsentationsweg	9
Abbildung 2.2:	Makroautophagie-assoziierte Proteine, die bei der Bildung von Autophagosomen zusammenwirken	13
Abbildung 2.3:	Autophagie-abhängige Präsentation zytosolischer Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen	16
Abbildung 2.4:	Die Regulation von Autophagie durch mTOR	21
Abbildung 5.1:	Schematische Darstellung des Tet-On und E-KRAB-Systems.....	57
Abbildung 5.2:	NucNeoR wird Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängig exprimiert und auf MHC-II präsentiert	59
Abbildung 5.3:	Die Präsentation von NucNeoR erfolgt Autophagie-abhängig auf MHC-Klasse-II	60
Abbildung 5.4:	EBNA3C wird Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängig exprimiert und auf MHC-II präsentiert	61
Abbildung 5.5:	Die Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II erfolgt Autophagie-abhängig	62
Abbildung 5.6:	Die Expression Beclin-1-spezifischer shRNA, nicht jedoch einer gegen Luciferase gerichteten Kontroll-shRNA, führt zu einem <i>knock-down</i> von überexprimiertem Beclin-1 in HEK293T-Zellen	63
Abbildung 5.7:	Doxyzyklin-abhängiger <i>knock-down</i> von Beclin-1 in stabil transfizierten Raji-Zellen	63
Abbildung 5.8:	Der <i>knock-down</i> von Beclin-1 beeinträchtigt nicht die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II	66
Abbildung 5.9:	Auch ein zeitlich der Antigenexpression vorgeschalteter <i>knock-down</i> von Beclin-1 beeinträchtigt nicht signifikant die Präsentation von EBNA3C auf MHC-Klasse-II.....	67
Abbildung 5.10:	Die Präsentation von EBNA3C wird durch die gleichzeitige Expression von Atg5 oder einer dominant negativen Variante von Atg5 nicht beeinflusst.....	70
Abbildung 5.11:	NeoR-GFP wird durch 3-MA stabilisiert und sowohl durch Atg5 als auch dnAtg5 destabilisiert	71
Abbildung 5.12:	Rapamycin hemmt ab einer Konzentration von 100 nM und Everolimus ab einer Konzentration von 10nM die Präsentation von exogenem Antigen auf MHC-II	72
Abbildung 5.13:	Rapamycin, nicht jedoch Everolimus, induziert in den nicht-toxischen Konzentrationen Autophagie.....	73
Abbildung 5.14:	Die Behandlung der antigenpräsentierenden Zellen mit den mTOR-Inhibitoren Rapamycin und Everolimus führt nicht zu einer Verstärkung der Autophagie-abhängigen endogenen Präsentation auf MHC-II	74

Abbildung 5.15:	Die Expression Raptor-spezifischer shRNA, nicht jedoch einer gegen Luciferase gerichteten Kontroll-shRNA, führt zu einem <i>knock-down</i> von überexprimiertem Raptor in HEK293T-Zellen.....	75
Abbildung 5.16:	Doxyzyklin-regulierter <i>knock-down</i> von p62 in stabil transfizierten Raji-Zellen	77
Abbildung 5.17:	Der <i>knock-down</i> von p62 hemmt die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II	78
Abbildung 5.18:	Die Präsentation von BRLF1 auf MHC-Klasse-II erfolgt Autophagie-abhängig	80
Abbildung 5.19:	Der <i>knock-down</i> von p62 führt zu einer verminderten Präsentation von BRLF1 auf MHC-II, aber nicht auf MHC-I	81
Abbildung 5.20:	Die CD4+ T-Zellerkennung korreliert nicht mit der BRLF1-Proteinmenge	82
Abbildung 5.21:	Die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II wird durch die Ubiquitin K63R-Mutante inhibiert	84
Abbildung 5.22:	EBNA3C wird in allen Ubiquitin-Transfektanten ähnlich hoch exprimiert -	85
Abbildung 5.23:	Die Autophagie-abhängige, endogene Präsentation von BRLF1 auf MHC-II wird durch die K63R-Ubiquitinmutante inhibiert	86
Abbildung 5.24:	Die Präsentation von BRLF1 auf MHC-I wird durch die K48R- und die Ub-K1-7-Ubiquitinmutanten, nicht jedoch durch die Ubiquitinmutante Ub-K63R inhibiert.....	87
Abbildung 5.25:	BRLF1 wird in allen Ubiquitin-Transfektanten ähnlich hoch exprimiert.....	88
Abbildung 5.26:	Die Ubiquitinmutanten Ub-K48R und Ub-K63R haben gegensätzliche Effekte auf die endogene Präsentation von BRLF1 auf MHC-I und MHC-II	90
Abbildung 5.27:	Die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression wird nicht wesentlich durch die Expression der verschiedenen Ubiquitinmutanten beeinflusst.....	92
Abbildung 5.28:	Die Präsentation von exogenem BRLF1 auf MHC-II wird durch die Expression der verschiedenen Ubiquitinmutanten nicht beeinflusst	94
Abbildung 5.29:	NeoR und Nuc-mut-NeoR sind im Zytoplasma und NucNeoR im Zellkern lokalisiert.....	95
Abbildung 5.30:	Die NeoR-Variante mit mutierter Kernlokalisationssequenz wird ähnlich effizient auf MHC-Klasse-II präsentiert wie NucNeoR.....	96
Abbildung 5.31:	Die NeoR-Variante, an die eine Abfolge von Argininen oder von Lysinen angehängt wurde, wird ebenso effizient wie die nukleäre Variante von NeoR auf MHC-Klasse-II präsentiert	97
Abbildung 5.32:	Nachweis der verschiedenen NeoR-Varianten mittels Western Blot.....	98
Abbildung 5.33:	Die Mutation von ubiquitylierbaren Aminosäuren in BZLF1 vermindert nicht die Präsentation des EBNA3C-Epitops auf MHC-II.....	99

Abbildung 5.34: Die Mutation sämtlicher ubiquitinylierbarer Aminosäuren im BZLF1-Protein beeinträchtigt nicht die endogene Präsentation auf MHC-II	101
Abbildung 5.35: Die Mutation sämtlicher ubiquitinylierbarer Aminosäuren im MART1-Protein beeinträchtigt nicht die endogene Präsentation auf MHC-II	103

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Chemikalien	24
Tabelle 3.2:	Geräte	25
Tabelle 3.3:	Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 3.4:	Allgemeine Puffer und Lösungen	27
Tabelle 3.5:	Zellkulturmedien	27
Tabelle 3.6:	Verwendete LCL und LCL Z(-) und deren HLA-Genotypen	28
Tabelle 3.7:	Verwendete Burkitt-Lymphom Zelllinien und deren HLA-Genotypen	29
Tabelle 3.8:	T-Zellklone	29
Tabelle 3.9:	T-Zelllinien	30
Tabelle 3.10:	Oligonukleotide für die Klonierung von shRNAs	30
Tabelle 3.11:	Plasmide	31
Tabelle 3.12:	Primärantikörper	34
Tabelle 3.13:	Sekundärantikörper	35
Tabelle 3.14:	Zytokine	35
Tabelle 4.1:	Transfektions-Mix für die Transfektion von HEK293T-Zellen eines Lochs einer 6-Loch-Platte	39
Tabelle 4.2:	Ansatz für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	46
Tabelle 4.3:	Ansatz für die Synthese von glatten Enden mittels T4-DNA- Polymerase	47
Tabelle 4.4:	Standard PCR-Ansatz	48
Tabelle 4.5:	Standard PCR-Programm mit 30-45 Zyklen	48
Tabelle 4.6:	Ansatz der Ligation	50
Tabelle 4.7:	Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Primärantikörper	53

9 Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
α	anti/alpha
AA	<i>amino acid</i>
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β	beta
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CLIP	<i>class II invariant chain associated peptide</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	<i>cytotoxic T cell</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DMEM	Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Ery	Erythromycin
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
γ	gamma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gy	<i>gray</i>
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HEK	<i>human embryonic kidney cell</i>
HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen

HL	Hodgkin-Lymphom
H ₂ O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	humanes Serum
Hsp	Hitzeschockprotein
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IFN	Interferon
Ii	invariante Kette
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
Lamp	Lysosomen assoziiertes Membranprotein
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP	<i>latent membrane protein</i>
M	Mol(ar)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MIIC	MHC-Klasse-II-Kompartiment
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
ml	Milliliter
min	Minute
mind.	mindestens
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol(ar)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	normal
NaCl	Natriumchlorid
NeoR	Neomycin-Phosphotransferase II
NGF-R	<i>nerve growth factor receptor</i>
NK	Natürliche Killer (Zelle)
NLS	Kernlokalisierungssequenz (<i>nuclear localization sequence</i>)
nm	Nanometer
nM	Nanomol(ar)
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
oriP	plasmidaler Replikationsursprung von EBV
p	Passage
p.A.	pro analysi
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin/ Phosphatidylethanolamin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd

PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PIP ₂	Phosphatidylinositbiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ	Phospholipase C-γ
p Ery	Erythromycin-regulierbarer Promotor
p Tet-bi	bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCC	Nierenzellkarzinom (<i>renal cell carcinoma</i>)
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RRE	<i>Rta-responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek	Sekunde(n)
T	Tween-20
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrorefaktor
(m)TOR	<i>(mammalian) target of rapamycin</i>
Treg	regulatorische T-Zellen
U	Einheit für die Enzymaktivität (<i>unit</i>)
üN	über Nacht
UPS	<i>Ubiquitin proteasome system</i>
V	Volt
VCA	<i>viral capsid antigen</i>
v.a.	vor allem
WT	Wildtyp
x g	x-fache Schwerkraft
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

Verwendete Begriffe aus dem Englischen wurden in der Arbeit durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

10 Literaturverzeichnis

- ACKERMAN, A. L. & CRESSWELL, P. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*, 5, 678-84.
- AIT-GOUGHOUlte, M., KANDA, T., MEYER, K., RYERSE, J. S., RAY, R. B. & RAY, R. 2008. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol*, 82, 2241-9.
- AITA, V. M., LIANG, X. H., MURTY, V. V., PINCUS, D. L., YU, W., CAYANIS, E., KALACHIKOV, S., GILLIAM, T. C. & LEVINE, B. 1999. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59, 59-65.
- ALBIGER, B., DAHLBERG, S., HENRIQUES-NORMARK, B. & NORMARK, S. 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med*, 261, 511-28.
- ALTMANN, M. & HAMMERSCHMIDT, W. 2005. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol*, 3, e404.
- ANIENTO, F., ROCHE, E., CUERVO, A. M. & KNECHT, E. 1993. Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *J Biol Chem*, 268, 10463-70.
- AXE, E. L., WALKER, S. A., MANIFAVA, M., CHANDRA, P., RODERICK, H. L., HABERMANN, A., GRIFFITHS, G. & KTISTAKIS, N. T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182, 685-701.
- BABU, J. R., GEETHA, T. & WOOTEN, M. W. 2005. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem*, 94, 192-203.
- BECKER-HAPAK, M., MCALLISTER, S. S. & DOWDY, S. F. 2001. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*, 24, 247-56.
- BEVAN, M. J. 1976. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol*, 117, 2233-8.
- BIRNKAMMER, I. 2008. Genetische Untersuchung der Autophagie-abhängigen Antigenpräsentation (Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München).
- BJORKOY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., OVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BLOMMAART, E. F., KRAUSE, U., SCHELLENS, J. P., VREELING-SINDELAROVA, H. & MEIJER, A. J. 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 243, 240-6.
- BOLAND, B., KUMAR, A., LEE, S., PLATT, F. M., WEGIEL, J., YU, W. H. & NIXON, R. A. 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons:

- relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 28, 6926-37.
- BORNKAMM, G. W., BERENS, C., KUKLIK-ROOS, C., BECHET, J. M., LAUX, G., BACHL, J., KORNDORFER, M., SCHLEE, M., HOLZEL, M., MALAMOUSSI, A., CHAPMAN, R. D., NIMMERJAHN, F., MAUTNER, J., HILLEN, W., BUJARD, H. & FEUILLARD, J. 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res*, 33, e137.
- BOUVIER, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol*, 39, 697-706.
- CHICZ, R. M., URBAN, R. G., GORGA, J. C., VIGNALI, D. A., LANE, W. S. & STROMINGER, J. L. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med*, 178, 27-47.
- CHUA, C. E., GAN, B. Q. & TANG, B. L. 2011. Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cell Mol Life Sci*, 68, 3349-58.
- CIECHANOVER, A. & BEN-SAADON, R. 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*, 14, 103-6.
- CIECHOMSKA, I. A., GOEMANS, G. C., SKEPPER, J. N. & TOLKOVSKY, A. M. 2009. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene*, 28, 2128-41.
- CODOGNO, P. & MEIJER, A. J. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1509-18.
- COMBER, J. D., ROBINSON, T. M., SICILIANO, N. A., SNOOK, A. E. & EISENLOHR, L. C. 2011. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to major histocompatibility complex class II-restricted presentation. *J Virol*, 85, 6453-63.
- CUERVO, A. M. & DICE, J. F. 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273, 501-3.
- DANIEL, F., LEGRAND, A., PESSAYRE, D., BORREGA-PIRES, F., MBIDA, L., LARDEUX, B., DEGOTT, C., VAN NHIEU, J. T. & BERNUAU, D. 2007. Beclin 1 mRNA strongly correlates with Bcl-XLmRNA expression in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Invest*, 25, 226-31.
- DENGJEL, J., SCHOOR, O., FISCHER, R., REICH, M., KRAUS, M., MULLER, M., KREYMBORG, K., ALTENBEREND, F., BRANDENBURG, J., KALBACHER, H., BROCK, R., DRIESSEN, C., RAMMENSEE, H. G. & STEVANOVIC, S. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7922-7.
- DICE, J. F. 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 15, 305-9.
- DJAVAHERI-MERGNY, M., MAIURI, M. C. & KROEMER, G. 2010. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, 29, 1717-9.
- DONALDSON, K. M., LI, W., CHING, K. A., BATALOV, S., TSAI, C. C. & JOAZEIRO, C. A. 2003. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8892-7.

- DONGRE, A. R., KOVATS, S., DEROOS, P., MCCORMACK, A. L., NAKAGAWA, T., PAHARKOVA-VATCHKOVA, V., ENG, J., CALDWELL, H., YATES, J. R., 3RD & RUDENSKY, A. Y. 2001. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol*, 31, 1485-94.
- DREUX, M., GASTAMINZA, P., WIELAND, S. F. & CHISARI, F. V. 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14046-51.
- DUNCAN, L. M., PIPER, S., DODD, R. B., SAVILLE, M. K., SANDERSON, C. M., LUZIO, J. P. & LEHNER, P. J. 2006. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J*, 25, 1635-45.
- DURAN, A., AMANCHY, R., LINARES, J. F., JOSHI, J., ABU-BAKER, S., POROLLO, A., HANSEN, M., MOSCAT, J. & DIAZ-MECO, M. T. 2011. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*, 44, 134-46.
- EDWARDS, K. M., DAVIS, J. E., BROWNE, K. A., SUTTON, V. R. & TRAPANI, J. A. 1999. Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunol Cell Biol*, 77, 76-89.
- ENGLISH, L., CHEMALI, M., DURON, J., RONDEAU, C., LAPLANTE, A., GINGRAS, D., ALEXANDER, D., LEIB, D., NORBURY, C., LIPPE, R. & DESJARDINS, M. 2009. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol*, 10, 480-7.
- ERPAPAZOGLU, Z., DHAOUI, M., PANTAZOPOULOU, M., GIORDANO, F., MARI, M., LEON, S., RAPOSO, G., REGGIORI, F. & HAGUENAUER-TSAPIS, R. 2012. A dual role for K63-linked ubiquitin chains in multivesicular body biogenesis and cargo sorting. *Mol Biol Cell*, 23, 2170-83.
- FENGSRUD, M., RAIBORG, C., BERG, T. O., STROMHAUG, P. E., UENO, T., ERICHSEN, E. S. & SEGLEN, P. O. 2000. Autophagosome-associated variant isoforms of cytosolic enzymes. *Biochem J*, 352 Pt 3, 773-81.
- FOSTER, D. A. & TOSCHI, A. 2009. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle*, 8, 1026-9.
- GAMERDINGER, M., HAJIEVA, P., KAYA, A. M., WOLFRUM, U., HARTL, F. U. & BEHL, C. 2009. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J*, 28, 889-901.
- GANLEY, I. G., LAM DU, H., WANG, J., DING, X., CHEN, S. & JIANG, X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284, 12297-305.
- GANNAGE, M., DORMANN, D., ALBRECHT, R., DENGJEL, J., TOROSSO, T., RAMER, P. C., LEE, M., STROWIG, T., ARREY, F., CONENELLO, G., PYPAERT, M., ANDERSEN, J., GARCIA-SASTRE, A. & MUNZ, C. 2009. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*, 6, 367-80.
- GARCIA-MARTINEZ, J. M. & ALESSI, D. R. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, 416, 375-85.
- GEPPERT, T. D. & LIPSKY, P. E. 1985. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as

- antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J Immunol*, 135, 3750-62.
- GLIMCHER, L. H. & MURPHY, K. M. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*, 14, 1693-711.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W. & BUJARD, H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, 1766-9.
- HAMACHER-BRADY, A., BRADY, N. R. & GOTTLIEB, R. A. 2006. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 281, 29776-87.
- HANADA, T., NODA, N. N., SATOMI, Y., ICHIMURA, Y., FUJIOKA, Y., TAKAO, T., INAGAKI, F. & OHSUMI, Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*, 282, 37298-302.
- HARA, T., NAKAMURA, K., MATSUI, M., YAMAMOTO, A., NAKAHARA, Y., SUZUKI-MIGISHIMA, R., YOKOYAMA, M., MISHIMA, K., SAITO, I., OKANO, H. & MIZUSHIMA, N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441, 885-9.
- HARA, T., TAKAMURA, A., KISHI, C., IEMURA, S., NATSUME, T., GUAN, J. L. & MIZUSHIMA, N. 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*, 181, 497-510.
- HAYASHI-NISHINO, M., FUJITA, N., NODA, T., YAMAGUCHI, A., YOSHIMORI, T. & YAMAMOTO, A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 11, 1433-7.
- HEATH, W. R. & CARBONE, F. R. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*, 1, 126-34.
- HEITMAN, J., MOVVA, N. R. & HALL, M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905-9.
- HENELL, F., BERKENSTAM, A., AHLBERG, J. & GLAUMANN, H. 1987. Degradation of short- and long-lived proteins in perfused liver and in isolated autophagic vacuoles--lysosomes. *Exp Mol Pathol*, 46, 1-14.
- HOFMANN, M. W., HONING, S., RODIONOV, D., DOBBERSTEIN, B., VON FIGURA, K. & BAKKE, O. 1999. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem*, 274, 36153-8.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J. L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20, 1981-91.
- HOU, W., HAN, J., LU, C., GOLDSTEIN, L. A. & RABINOWICH, H. 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 6, 891-900.
- HSING, L. C. & RUDENSKY, A. Y. 2005. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, 207, 229-41.
- IWATA, A., RILEY, B. E., JOHNSTON, J. A. & KOPITO, R. R. 2005. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*, 280, 40282-92.

- JACINTO, E., FACCHINETTI, V., LIU, D., SOTO, N., WEI, S., JUNG, S. Y., HUANG, Q., QIN, J. & SU, B. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 127, 125-37.
- JAGANNATH, C., LINDSEY, D. R., DHANDAYUTHAPANI, S., XU, Y., HUNTER, R. L., JR. & EISSA, N. T. 2009. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med*, 15, 267-76.
- JIANG, X. & CHEN, Z. J. 2012. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol*, 12, 35-48.
- JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KUNDU, M. & KIM, D. H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20, 1992-2003.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- KAMADA, Y., FUNAKOSHI, T., SHINTANI, T., NAGANO, K., OHSUMI, M. & OHSUMI, Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, 150, 1507-13.
- KAMADA, Y., YOSHINO, K., KONDO, C., KAWAMATA, T., OSHIRO, N., YONEZAWA, K. & OHSUMI, Y. 2010. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol*, 30, 1049-58.
- KANG, R., ZEH, H. J., LOTZE, M. T. & TANG, D. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18, 571-80.
- KAWAGUCHI, Y., KOVACS, J. J., MCLAURIN, A., VANCE, J. M., ITO, A. & YAO, T. P. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, 115, 727-38.
- KELLY, G. L., LONG, H. M., STYLIANOU, J., THOMAS, W. A., LEESE, A., BELL, A. I., BORNKAMM, G. W., MAUTNER, J., RICKINSON, A. B. & ROWE, M. 2009. An Epstein-Barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed in transformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 link. *PLoS Pathog*, 5, e1000341.
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110, 163-75.
- KIRKIN, V., LAMARK, T., SOU, Y. S., BJORKOY, G., NUNN, J. L., BRUUN, J. A., SHVETS, E., MCEWAN, D. G., CLAUSEN, T. H., WILD, P., BILUSIC, I., THEURILLAT, J. P., OVERVATN, A., ISHII, T., ELAZAR, Z., KOMATSU, M., DIKIC, I. & JOHANSEN, T. 2009. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 33, 505-16.
- KLIONSKY, D. J., ABELIOVICH, H., AGOSTINIS, P., AGRAWAL, D. K., ALIEV, G., ASKEW, D. S., BABA, M., BAEHRECKE, E. H., BAHR, B. A., BALLABIO, A., BAMBER, B. A., BASSHAM, D. C., BERGAMINI, E., BI, X., BIARD-PIECHACZYK, M., BLUM, J. S., BREDESEN, D. E., BRODSKY, J. L., BRUMELL, J. H., BRUNK, U. T., BURSCH, W., CAMOUGRAND, N., CEBOLLERO, E., CECCONI, F., CHEN, Y., CHIN, L. S., CHOI, A., CHU, C. T., CHUNG, J., CLARKE, P. G., CLARK, R. S., CLARKE, S. G., CLAVE, C., CLEVELAND, J. L., CODOGNO, P., COLOMBO, M. I., COTO-MONTES, A., CREGG, J. M., CUERVO, A. M., DEBNATH, J., DEMARCHI, F., DENNIS, P. B., DENNIS, P. A., DERETIC, V., DEVENISH, R. J., DI SANO, F., DICE, J. F., DIFIGLIA, M., DINESH-KUMAR, S., DISTELHORST, C. W., DJAVAHERI-

- MERGNY, M., DORSEY, F. C., DROGE, W., DRON, M., DUNN, W. A., JR., DUSZENKO, M., EISSA, N. T., ELAZAR, Z., ESCLATINE, A., ESKELINEN, E. L., FESUS, L., FINLEY, K. D., FUENTES, J. M., FUEYO, J., FUJISAKI, K., GALLIOT, B., GAO, F. B., GEWIRTZ, D. A., GIBSON, S. B., GOHLA, A., GOLDBERG, A. L., GONZALEZ, R., GONZALEZ-ESTEVEZ, C., GORSKI, S., GOTTLIEB, R. A., HAUSSINGER, D., HE, Y. W., HEIDENREICH, K., HILL, J. A., HOYER-HANSEN, M., HU, X., HUANG, W. P., IWASAKI, A., JAATTELA, M., JACKSON, W. T., JIANG, X., JIN, S., JOHANSEN, T., JUNG, J. U., KADOWAKI, M., KANG, C., KELEKAR, A., KESSEL, D. H., KIEL, J. A., KIM, H. P., KIMCHI, A., KINSELLA, T. J., KISELYOV, K., KITAMOTO, K., KNECHT, E., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-75.
- KNAEVELSRUD, H. & SIMONSEN, A. 2010. Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. *FEBS Lett*, 584, 2635-45.
- KONERI, K., GOI, T., HIRONO, Y., KATAYAMA, K. & YAMAGUCHI, A. 2007. Beclin 1 gene inhibits tumor growth in colon cancer cell lines. *Anticancer Res*, 27, 1453-7.
- KRAFT, C., PETER, M. & HOFMANN, K. 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol*, 12, 836-41.
- KU, B., WOO, J. S., LIANG, C., LEE, K. H., HONG, H. S., E, X., KIM, K. S., JUNG, J. U. & OH, B. H. 2008. Structural and biochemical bases for the inhibition of autophagy and apoptosis by viral BCL-2 of murine gamma-herpesvirus 68. *PLoS Pathog*, 4, e25.
- KYEI, G. B., DINKINS, C., DAVIS, A. S., ROBERTS, E., SINGH, S. B., DONG, C., WU, L., KOMINAMI, E., UENO, T., YAMAMOTO, A., FEDERICO, M., PANGANIBAN, A., VERGNE, I. & DERETIC, V. 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*, 186, 255-68.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANDSVERK, O. J., BAKKE, O. & GREGERS, T. F. 2009. MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand J Immunol*, 70, 184-93.
- LANFORD, R. E. & BUTEL, J. S. 1984. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell*, 37, 801-13.
- LEE, H. K., MATTEI, L. M., STEINBERG, B. E., ALBERTS, P., LEE, Y. H., CHERVONSKY, A., MIZUSHIMA, N., GRINSTEIN, S. & IWASAKI, A. 2010. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity*, 32, 227-39.
- LEE, J. A. 2012. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? *Exp Neurol*, 21, 1-8.
- LEIB, D. A., ALEXANDER, D. E., COX, D., YIN, J. & FERGUSON, T. A. 2009. Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses. *J Virol*, 83, 12164-71.
- LEVY, F., MUEHLETHALER, K., SALVI, S., PEITREQUIN, A. L., LINDHOLM, C. K., CEROTTINI, J. C. & RIMOLDI, D. 2005. Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. *Mol Biol Cell*, 16, 1777-87.

- LI, B., LEI, Z., LICHTY, B. D., LI, D., ZHANG, G. M., FENG, Z. H., WAN, Y. & HUANG, B. 2010. Autophagy facilitates major histocompatibility complex class I expression induced by IFN-gamma in B16 melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 313-21.
- LI, Y., WANG, L. X., YANG, G., HAO, F., URBA, W. J. & HU, H. M. 2008. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res*, 68, 6889-95.
- LIAN, J., WU, X., HE, F., KARNAK, D., TANG, W., MENG, Y., XIANG, D., JI, M., LAWRENCE, T. S. & XU, L. 2011. A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer via modulating Bcl-2-Becclin1 interaction at endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*, 18, 60-71.
- LIANG, X. H., JACKSON, S., SEAMAN, M., BROWN, K., KEMPKE, B., HIBSHOOSH, H. & LEVINE, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-6.
- LICH, J. D., ELLIOTT, J. F. & BLUM, J. S. 2000. Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *J Exp Med*, 191, 1513-24.
- LIU, Y., TESTA, J. S., PHILIP, R., BLOCK, T. M. & MEHTA, A. S. 2011. A ubiquitin independent degradation pathway utilized by a hepatitis B virus envelope protein to limit antigen presentation. *PLoS One*, 6, e24477.
- LOGUE, S. E. & MARTIN, S. J. 2008. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 36, 1-9.
- LONG, J., GALLAGHER, T. R., CAVEY, J. R., SHEPPARD, P. W., RALSTON, S. H., LAYFIELD, R. & SEARLE, M. S. 2008. Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch. *J Biol Chem*, 283, 5427-40.
- MAMMUCARI, C., MILAN, G., ROMANELLO, V., MASIERO, E., RUDOLF, R., DEL PICCOLO, P., BURDEN, S. J., DI LISI, R., SANDRI, C., ZHAO, J., GOLDBERG, A. L., SCHIAFFINO, S. & SANDRI, M. 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 6, 458-71.
- MARTINET, W., VERHEYE, S. & DE MEYER, G. R. 2007. Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *Autophagy*, 3, 241-4.
- MASSEY, A. C., ZHANG, C. & CUERVO, A. M. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol*, 73, 205-35.
- MATSUKI, Y., OHMURA-HOSHINO, M., GOTO, E., AOKI, M., MITO-YOSHIDA, M., UEMATSU, M., HASEGAWA, T., KOSEKI, H., OHARA, O., NAKAYAMA, M., TOYOOKA, K., MATSUOKA, K., HOTTA, H., YAMAMOTO, A. & ISHIDO, S. 2007. Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J*, 26, 846-54.
- MATSUNAGA, K., SAITOH, T., TABATA, K., OMORI, H., SATOH, T., KUROTORI, N., MAEJIMA, I., SHIRAHAMA-NODA, K., ICHIMURA, T., ISOBE, T., AKIRA, S., NODA, T. & YOSHIMORI, T. 2009. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol*, 11, 385-96.
- MATSUURA, A., TSUKADA, M., WADA, Y. & OHSUMI, Y. 1997. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192, 245-50.

- MEDANA, I. M., GALLIMORE, A., OXENIUS, A., MARTINIC, M. M., WEKERLE, H. & NEUMANN, H. 2000. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol*, 30, 3623-33.
- MEIJER, A. J. & CODOGNO, P. 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2445-62.
- MIRACCO, C., COSCI, E., OLIVERI, G., LUZI, P., PACENTI, L., MONCIATTI, I., MANNUCCI, S., DE NISI, M. C., TOSCANO, M., MALAGNINO, V., FALZARANO, S. M., PIRTOLI, L. & TOSI, P. 2007. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol*, 30, 429-36.
- MIZUSHIMA, N. & LEVINE, B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*, 12, 823-30.
- MIZUSHIMA, N., NODA, T., YOSHIMORI, T., TANAKA, Y., ISHII, T., GEORGE, M. D., KLIONSKY, D. J., OHSUMI, M. & OHSUMI, Y. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-8.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140, 313-26.
- MULDER, D. J., POONI, A., MAK, N., HURLBUT, D. J., BASTA, S. & JUSTINICH, C. J. 2011. Antigen presentation and MHC class II expression by human esophageal epithelial cells: role in eosinophilic esophagitis. *Am J Pathol*, 178, 744-53.
- MUNZ, C. 2009. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol*, 27, 423-49.
- MUNZ, C. 2010. Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Curr Opin Immunol*, 22, 89-93.
- MUNZ, C. 2011. Beclin-1 targeting for viral immune escape. *Viruses*, 3, 1166-78.
- MUNZ, C. 2012. Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. *Front Immunol*, 3, 9.
- MUNZ, C., BICKHAM, K. L., SUBKLEWE, M., TSANG, M. L., CHAHROUDI, A., KURILLA, M. G., ZHANG, D., O'DONNELL, M. & STEINMAN, R. M. 2000. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Exp Med*, 191, 1649-60.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. 2008. Janeway's immunobiology. *Garland Science*, Seventh edition.
- NAKATOGAWA, H., ICHIMURA, Y. & OHSUMI, Y. 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130, 165-78.
- NARENDRA, D., TANAKA, A., SUEN, D. F. & YOULE, R. J. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183, 795-803.
- NEDJIC, J., AICHINGER, M., EMMERICH, J., MIZUSHIMA, N. & KLEIN, L. 2008. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*, 455, 396-400.
- NEEFJES, J., JONGSMA, M. L., PAUL, P. & BAKKE, O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, 11, 823-36.

- NEUFELD, T. P. 2012. Autophagy and cell growth - the yin and yang of nutrient responses. *J Cell Sci*.
- NIMMERJAHN, F., MILOSEVIC, S., BEHREND, U., JAFFEE, E. M., PARDOLL, D. M., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2003. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol*, 33, 1250-9.
- NISHIDA, Y., ARAKAWA, S., FUJITANI, K., YAMAGUCHI, H., MIZUTA, T., KANASEKI, T., KOMATSU, M., OTSU, K., TSUJIMOTO, Y. & SHIMIZU, S. 2009. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, 461, 654-8.
- NYFELER, B., BERGMAN, P., TRIANTAFELLOW, E., WILSON, C. J., ZHU, Y., RADETICH, B., FINAN, P. M., KLIONSKY, D. J. & MURPHY, L. O. 2011. Relieving autophagy and 4EBP1 from rapamycin resistance. *Mol Cell Biol*, 31, 2867-76.
- ORVEDAHL, A., ALEXANDER, D., TALLOCHY, Z., SUN, Q., WEI, Y., ZHANG, W., BURNS, D., LEIB, D. A. & LEVINE, B. 2007. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*, 1, 23-35.
- ORVEDAHL, A., MACPHERSON, S., SUMPTER, R., JR., TALLOCHY, Z., ZOU, Z. & LEVINE, B. 2010. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe*, 7, 115-27.
- LOUDARD, S., MEDIONI, J., AYLLON, J., BARRASCOURT, E., ELAIDI, R. T., BALCACERES, J. & SCOTTE, F. 2009. Everolimus (RAD001): an mTOR inhibitor for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9, 705-17.
- PALUDAN, C., SCHMID, D., LANDTHALER, M., VOCKERODT, M., KUBE, D., TUSCHL, T. & MUNZ, C. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307, 593-6.
- PANDEY, U. B., NIE, Z., BATLEVI, Y., MCCRAY, B. A., RITSON, G. P., NEDELSKY, N. B., SCHWARTZ, S. L., DIPROSPERO, N. A., KNIGHT, M. A., SCHULDINER, O., PADMANABHAN, R., HILD, M., BERRY, D. L., GARZA, D., HUBBERT, C. C., YAO, T. P., BAEHRECKE, E. H. & TAYLOR, J. P. 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447, 859-63.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J. A., OUTZEN, H., OVERVATN, A., BJORKOY, G. & JOHANSEN, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- PATTINGRE, S., TASSA, A., QU, X., GARUTI, R., LIANG, X. H., MIZUSHIMA, N., PACKER, M., SCHNEIDER, M. D. & LEVINE, B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122, 927-39.
- PAUL, W. E. & SEDER, R. A. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76, 241-51.
- PICKART, C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70, 503-33.
- PIZZO, P. & POZZAN, T. 2007. Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol*, 17, 511-7.

- PONPUAK, M., DAVIS, A. S., ROBERTS, E. A., DELGADO, M. A., DINKINS, C., ZHAO, Z., VIRGIN, H. W. T., KYEI, G. B., JOHANSEN, T., VERGNE, I. & DERETIC, V. 2010. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity*, 32, 329-41.
- PYO, J. O., JANG, M. H., KWON, Y. K., LEE, H. J., JUN, J. I., WOO, H. N., CHO, D. H., CHOI, B., LEE, H., KIM, J. H., MIZUSHIMA, N., OSHUMI, Y. & JUNG, Y. K. 2005. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*, 280, 20722-9.
- RAMMENSEE, H. G., FALK, K. & ROTZSCHKE, O. 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol*, 5, 35-44.
- REITS, E. A., VOS, J. C., GROMME, M. & NEEFJES, J. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 404, 774-8.
- RIEDEL, A. 2007. Untersuchungen zur endogenen MHC-Klasse-II-restringierten Präsentation nukleärer Antigene (Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg).
- RIEDEL, A., NIMMERJAHN, F., BURDACH, S., BEHREND, U., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2008. Endogenous presentation of a nuclear antigen on MHC class II by autophagy in the absence of CRM1-mediated nuclear export. *Eur J Immunol*, 38, 2090-5.
- RIKIISHI, H. 2012. Novel Insights into the Interplay between Apoptosis and Autophagy. *Int J Cell Biol*, 2012, 317645.
- SANGER, F. & COULSON, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94, 441-8.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SAVEANU, L., CARROLL, O., LINDO, V., DEL VAL, M., LOPEZ, D., LEPELLETIER, Y., GREER, F., SCHOMBURG, L., FRUCI, D., NIEDERMANN, G. & VAN ENDERT, P. M. 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol*, 6, 689-97.
- SCARLATTI, F., MAFFEI, R., BEAU, I., CODOGNO, P. & GHIDONI, R. 2008. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*, 15, 1318-29.
- SCHMID, D. & MUNZ, C. 2008. Localization and MHC class II presentation of antigens targeted for macroautophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 213-25.
- SCHMID, D., PYPAERT, M. & MUNZ, C. 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 26, 79-92.

- SCHUBERT, U., ANTON, L. C., GIBBS, J., NORBURY, C. C., YEWDELL, J. W. & BENNINK, J. R. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770-4.
- SEGLEN, P. O. & GORDON, P. B. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 1889-92.
- SEIFERT, U., BIALY, L. P., EBSTEIN, F., BECH-OTSCHIR, D., VOIGT, A., SCHROTER, F., PROZOROVSKI, T., LANGE, N., STEFFEN, J., RIEGER, M., KUCKELKORN, U., AKTAS, O., KLOETZEL, P. M. & KRUGER, E. 2010. Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell*, 142, 613-624.
- SHIMIZU, S., ARAKAWA, S. & NISHIDA, Y. 2010. Autophagy takes an alternative pathway. *Autophagy*, 6, 290-1.
- SIJTS, E. J. & KLOETZEL, P. M. 2011. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci*, 68, 1491-502.
- SLOTMAN, J. A., DA SILVA ALMEIDA, A. C., HASSINK, G. C., VAN DE VEN, R. H., VAN KERKHOF, P., KUIKEN, H. J. & STROUS, G. J. 2012. Ubc13 and COOH terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) are required for growth hormone receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 287, 15533-43.
- STALDER, T., HAHN, S. & ERB, P. 1994. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, 152, 1127-33.
- STREHL, B., TEXTORIS-TAUBE, K., JAKEL, S., VOIGT, A., HENKLEIN, P., STEINHOFF, U., KLOETZEL, P. M. & KUCKELKORN, U. 2008. Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage. *J Biol Chem*, 283, 17891-7.
- SUN, Y. & PENG, Z. 2008. Autophagy, Beclin 1, and Their Relation To Oncogenesis. *Lab Medicine*, 39, 287-290.
- SURI, A., WALTERS, J. J., ROHRS, H. W., GROSS, M. L. & UNANUE, E. R. 2008. First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J Immunol*, 180, 3849-56.
- SZETO, J., KANIUK, N. A., CANADIEN, V., NISMAN, R., MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T., BAZETT-JONES, D. P. & BRUMELL, J. H. 2006. ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*, 2, 189-99.
- TAYLOR, G. S., MAUTNER, J. & MUNZ, C. 2011. Autophagy in herpesvirus immune control and immune escape. *Herpesviridae*, 2, 2.
- TIAN, C. Y., ZHANG, L. Q. & HE, F. C. 2006. [Progress in the study of KRAB zinc finger protein]. *Yi Chuan*, 28, 1451-6.
- TIAN, S., LIN, J., JUN ZHOU, J., WANG, X., LI, Y., REN, X., YU, W., ZHONG, W., XIAO, J., SHENG, F., CHEN, Y., JIN, C., LI, S., ZHENG, Z. & XIA, B. 2010. Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. *Autophagy*, 6, 1032-41.
- TROWSDALE, J. 2005. HLA genomics in the third millennium. *Curr Opin Immunol*, 17, 498-504.
- TRUSCHEL, S. T., SIMOES, S., SETTY, S. R., HARPER, D. C., TENZA, D., THOMAS, P. C., HERMAN, K. E., SACKETT, S. D., COWAN, D. C., THEOS, A. C., RAPOSO, G. & MARKS, M. S. 2009. ESCRT-I function is required for Tyrp1

- transport from early endosomes to the melanosome limiting membrane. *Traffic*, 10, 1318-36.
- TURLEY, S. J., INABA, K., GARRETT, W. S., EBERSOLD, M., UNTERNAEHRER, J., STEINMAN, R. M. & MELLMAN, I. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, 288, 522-7.
- URRUTIA, R. 2003. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol*, 4, 231.
- VAN DEN BOORN, J. G., PICAUVET, D. I., VAN SWIETEN, P. F., VAN VEEN, H. A., KONIJNENBERG, D., VAN VELEN, P. A., VAN CAPEL, T., JONG, E. C., REITS, E. A., DRIJFHOUT, J. W., BOS, J. D., MELIEF, C. J. & LUITEN, R. M. 2011. Skin-depigmenting agent monobenzene induces potent T-cell autoimmunity toward pigmented cells by tyrosinase haptentation and melanosome autophagy. *J Invest Dermatol*, 131, 1240-51.
- VANDER HAAR, E., LEE, S. I., BANDHAKAVI, S., GRIFFIN, T. J. & KIM, D. H. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9, 316-23.
- WALSENG, E., FURUTA, K., BOSCH, B., WEIH, K. A., MATSUKI, Y., BAKKE, O., ISHIDO, S. & ROCHE, P. A. 2010. Ubiquitination regulates MHC class II-peptide complex retention and degradation in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20465-70.
- WANG, P., SIDNEY, J., DOW, C., MOTHE, B., SETTE, A. & PETERS, B. 2008. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol*, 4, e1000048.
- WANG, X., HERR, R. A., CHUA, W. J., LYBARGER, L., WIERTZ, E. J. & HANSEN, T. H. 2007. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol*, 177, 613-24.
- WATANABE, Y. & TANAKA, M. 2011. p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate. *J Cell Sci*, 124, 2692-701.
- WEARSCH, P. A. & CRESSWELL, P. 2008. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 624-31.
- WEBER, W., FUX, C., DAOUD-EL BABA, M., KELLER, B., WEBER, C. C., KRAMER, B. P., HEINZEN, C., AUBEL, D., BAILEY, J. E. & FUSSENEGGER, M. 2002. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol*, 20, 901-7.
- WENGER, T., TERAWAKI, S., CAMOSSETO, V., ABDELRASSOUL, R., MIES, A., CATALAN, N., CLAUDIO, N., CLAVARINO, G., DE GASSART, A., RIGOTTI, F. D., GATTI, E. & PIERRE, P. 2012. Autophagy inhibition promotes defective neosynthesized proteins storage in ALIS, and induces redirection toward proteasome processing and MHCI-restricted presentation. *Autophagy*, 8.
- WOOTEN, M. W., GEETHA, T., BABU, J. R., SEIBENHENER, M. L., PENG, J., COX, N., DIAZ-MECO, M. T. & MOSCAT, J. 2008. Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, 283, 6783-9.
- WOOTEN, M. W., HU, X., BABU, J. R., SEIBENHENER, M. L., GEETHA, T., PAINE, M. G. & WOOTEN, M. C. 2006. Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 62079.

- XIE, Z., NAIR, U. & KLIONSKY, D. J. 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19, 3290-8.
- YEWDELL, J. W. & NICCHITTA, C. V. 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol*, 27, 368-73.
- YOUSEFI, S., PEROZZO, R., SCHMID, I., ZIEMIECKI, A., SCHAFFNER, T., SCAPOZZA, L., BRUNNER, T. & SIMON, H. U. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, 8, 1124-32.
- YUE, Z., JIN, S., YANG, C., LEVINE, A. J. & HEINTZ, N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15077-82.
- ZALCKVAR, E., BERISSI, H., MIZRACHY, L., IDELCHUK, Y., KOREN, I., EISENSTEIN, M., SABANAY, H., PINKAS-KRAMARSKI, R. & KIMCHI, A. 2009. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep*, 10, 285-92.
- ZHAO, J., BRAULT, J. J., SCHILD, A., CAO, P., SANDRI, M., SCHIAFFINO, S., LECKER, S. H. & GOLDBERG, A. L. 2007. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*, 6, 472-83.
- ZHENG, Y. T., SHAHNAZARI, S., BRECH, A., LAMARK, T., JOHANSEN, T. & BRUMELL, J. H. 2009. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol*, 183, 5909-16.
- ZHOU, C., ZHONG, W., ZHOU, J., SHENG, F., FANG, Z., WEI, Y., CHEN, Y., DENG, X., XIA, B. & LIN, J. 2012. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy*, 8.
- ZHOU, D., LI, P., LIN, Y., LOTT, J. M., HISLOP, A. D., CANADAY, D. H., BRUTKIEWICZ, R. R. & BLUM, J. S. 2005. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity*, 22, 571-81.
- ZHOU, Z., JIANG, X., LIU, D., FAN, Z., HU, X., YAN, J., WANG, M. & GAO, G. F. 2009. Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy*, 5, 321-8.
- ZHU, K., DUNNER, K., JR. & MCCONKEY, D. J. 2010. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene*, 29, 451-62.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Josef Mautner und Prof. Dr. Uta Behrends für die Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Themas. Ganz herzlichen Dank vor allem an Josef für die gute wissenschaftliche Betreuung und für sein stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen sowie die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Weiß, die sich bereit erklärt hat das Zweitgutachten für meine Arbeit zu übernehmen

Natürlich bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Karzan, Max, Isabella, Julia, Steffi, Frau Lechner, Doris, und Nishant für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit!

Danke auch an Nina, Samantha und Kathi, die mir während meiner Zeit als Doktorandin oft zur Seite gestanden und mir sehr ans Herz gewachsen sind.

Ganz großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mir in den letzten Jahren in allen Lebenslagen sehr geholfen und mir immer wieder Rückhalt gegeben haben!

Von ganzem Herzen danke ich Stefan, der mir vor allem in der schwierigen Endphase meiner Dr. Arbeit unendlich viel Kraft gegeben und Verständnis aufgebracht hat!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, 05.November 2012

Heike Pfister